

**Untersuchungen zur Rolle des Transkriptionsfaktors Rrn3p
in der wachstumsabhängigen Regulation der rRNA-Synthese**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III – Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Anja Philippi

aus Püttlingen

Regensburg, Oktober 2007

Promotionsgesuch eingereicht am: 15.10.2007

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Herbert Tschochner

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Reinhard Wirth
1. Gutachter:	Prof. Dr. Herbert Tschochner
2. Gutachter:	Prof. Dr. Wolfgang Seufert
3. Prüfer:	Prof. Dr. Michael Thomm

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2007

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Herbert Tschochner am Biochemie-Zentrum (BZH) der Universität Heidelberg sowie am Lehrstuhl Biochemie III des Instituts für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie der Universität Regensburg angefertigt.

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit war bisher noch nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens, andere Promotionsversuche wurden nicht unternommen.

Regensburg, 10.01.2008

Für Sébastien,
in Liebe und Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Der Nukleolus als Ort der rRNA-Synthese	2
1.2	Die genomische Organisation der rDNA	4
1.3	Initiation der RNA-Polymerase I-Transkription am rDNA-Promotor	5
1.3.1	Die Struktur des rRNA-Gen-Promotors	6
1.3.2	Der Präinitiationskomplex der RNA-Polymerase I höherer Eukaryoten	6
1.3.3	Der Präinitiationskomplex der RNA-Polymerase I in der Hefe <i>S. cerevisiae</i>	8
1.4	Termination der RNA-Polymerase I-Transkription	10
1.5	Regulation der RNA-Polymerase I-Transkription	11
1.5.1	Regulation der rDNA-Transkription auf Chromatinebene	12
1.5.2	Die Bedeutung des RNA-Polymerase I-Rrn3-Komplexes für die wachstumsabhängige Regulation der rRNA-Synthese	13
1.5.3	Der RNA-Polymerase I-Rrn3p-Komplex in der Hefe <i>S. cerevisiae</i>	14
1.5.4	Bedeutung des Initiationsfaktors TIF-IA für die Regulation der RNA-Polymerase I-Transkription in Säugern	15
1.5.5	Bedeutung der anderen basalen Initiationsfaktoren für die Regulation der RNA-Polymerase I-Transkription	16
1.5.6	Regulation der RNA-Polymerase I-Transkription auf Elongationsebene	17
1.5.7	Weitere potenzielle Regulatoren der RNA-Polymerase I-Transkription	18
1.6	Die Ribosomenbiogenese im Überblick	19
1.7	Fragestellung	22
2	ERGEBNISSE	23
2.1	Vergleich der in wachsenden und wachstumsarretierten <i>S. cerevisiae</i> -Zellen vorkommenden Rrn3p- und RNA-Polymerase I-Mengen	23
2.2	Untersuchung der Rrn3p-Stabilität in Hefemutanten mit eingeschränkter Proteasom- bzw. Vakuolenfunktion	25
2.3	Auswirkungen unterschiedlicher Rrn3p-Mengen auf das Hefewachstum und die rRNA-Syntheserate	27
2.3.1	Der Tetracyclin-regulierbare TetO-Promotor	28
2.3.2	Der yTHC-Stamm pTet-Rrn3-HA ₃	28
2.3.3	Charakterisierung des TetO-Promotor-Stammes pTet ₇ -Rrn3-Prot.A	30
2.3.4	Einfluss unterschiedlicher zellulärer Rrn3p-Mengen auf das Hefewachstum und die rRNA-Syntheserate	33
2.4	Charakterisierung der Deletionsmutante pNOP1-Rrn3-ΔN-Prot.A	37
2.5	Bedeutung des Rrn3p-Abbaus für den in wachstumsinhibierten Hefen stattfindenden Verlust der Pol I-Rrn3p-Komplexe	42
2.5.1	Charakterisierung der RNA-Polymerase I-Rrn3p-Interaktion mit Hilfe von Gelfiltrationsexperimenten	42
2.5.2	Untersuchung der RNA-Polymerase I-Rrn3p-Interaktion mit Hilfe von Koimmunpräzipitationen	45
2.6	Lokalisierung des Rrn3p in wachsenden und wachstumsarretierten Hefezellen	49
2.7	Untersuchung der rDNA-Okkupanzen des Rrn3p, der RNA-Polymerase I und des Core-Faktors in wachsenden und wachstumsinhibierten Zellen der Rrn3-ΔN-Mutante	53
2.8	Einfluss des Rrn3p-Abbaus auf die RNA-Polymerase I-Transkription	57

3	DISKUSSION	61
3.1	In wachstumsarretierten <i>S. cerevisiae</i> -Zellen degradiert das 26S-Proteasom einen Großteil des Transkriptionsfaktors Rrn3p	63
3.2	Unterschiedliche Rrn3p-Mengen wirken sich sowohl auf die rRNA-Syntheserate als auch auf das Hefewachstum aus	65
3.3	Die verkürzte Rrn3p-Version Rrn3p-ΔN-Prot.A wird unter ungünstigen Wachstumsbedingungen nicht abgebaut	67
3.4	In wachstumshemmen Hefezellen trägt der Abbau des Rrn3p zum Verlust der RNA-Polymerase I-Rrn3p-Komplexe bei	68
3.5	In wachstumsarretierten Hefezellen findet keine Rrn3p-Relokalisation statt	72
3.6	In wachstumshemmen Hefen hängt die rDNA-Okkupanz der RNA-Polymerase I von der Menge der vorhandenen Pol I-Rrn3p-Komplexe ab	73
3.7	In wachstumsarretierten Hefen trägt der Rrn3p-Abbau zur Repression der RNA-Polymerase I-Transkription bei	74
3.8	Wie wird bei einem Wachstumsarrest die rRNA-Synthese reprimiert?	75
3.9	Wird bei einem Wachstumsarrest auch die elongierende RNA-Polymerase I inhibiert?	76
3.10	Ausblick	78
4	MATERIAL UND METHODEN	79
4.1	Chemikalien und Reagenzien und deren Bezugsquellen	79
4.2	Häufig verwendete Medien und Puffer	79
4.2.1	Medien	79
4.2.2	Puffer	80
4.3	Häufig verwendete Geräte	81
4.4	Verwendete Hefestämme, Bakterien, Plasmide und Oligonukleotide	81
4.4.1	Verwendete <i>S. cerevisiae</i> -Stämme	81
4.4.2	Verwendete <i>E. coli</i> -Zellen	83
4.4.3	Verwendete Plasmide	83
4.4.4	Verwendete Oligonukleotide	84
4.5	Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>S. cerevisiae</i>)	85
4.5.1	Kultur von <i>S. cerevisiae</i>	85
4.5.2	Ernte von <i>S. cerevisiae</i> -Kulturen	86
4.5.3	Dauerkulturen von <i>S. cerevisiae</i>	86
4.5.4	Bestimmung der optischen Dichte von Hefekulturen	86
4.5.5	Messung von Wachstumskurven	87
4.5.6	Phänotypische Charakterisierung von Hefestämmen durch Tüpfeltests	87
4.5.7	Experimente mit temperatursensitiven Hefemutanten	87
4.5.8	Durchführung von Aminosäuredepletionen	87
4.5.9	Behandlung von <i>S. cerevisiae</i> mit Rapamycin und Cycloheximid	88
4.5.10	Behandlung von <i>S. cerevisiae</i> mit Doxycyclin	88
4.5.11	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	88
4.5.12	Replika-Plattierung	89
4.5.13	Selektion gegen Hefestämme mit Uracil-Prototrophie mittels 5-FOA	89
4.5.14	Konstruktion verwendeter <i>S. cerevisiae</i> -Stämme	90

4.6	Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	94
4.6.1	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (Rubidiumchlorid-Methode)	94
4.6.2	Transformation von <i>E. coli</i> -Bakterien mit Plasmid-DNA	94
4.7	DNA-Techniken	95
4.7.1	Trennung von DNA in nativen Agarosegelen	95
4.7.2	Trennung von DNA in nativen Polyacrylamidgelen	95
4.7.3	DNA-Konzentrationsbestimmung	96
4.7.4	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> im kleinen Maßstab (Plasmid-Minipräp)	97
4.7.5	Isolierung genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	97
4.7.6	PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	97
4.7.7	Quantitative PCR (qPCR)	99
4.7.8	Aufreinigung von PCR-Produkten	101
4.7.9	Klonierung von DNA-Fragmenten	101
4.7.10	DNA-Sequenzierung	105
4.7.11	Klonierung der verwendeten Plasmide	105
4.8	RNA-Techniken	107
4.8.1	Arbeiten mit ^3H -markierter RNA	107
4.8.2	RNA-Markierung mit [5, 6- ^3H]-Uracil (In-vivo-Pulse-Labeling)	107
4.8.3	Reinigung der ^3H -markierten Gesamt-RNA aus <i>S. cerevisiae</i>	107
4.8.4	Messung der ^3H -Inkorporation	108
4.8.5	Trennung von RNA in nativen Agarosegelen	108
4.8.6	Trennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen	109
4.8.7	RNA-Blotting	109
4.8.8	Fixierung der RNA auf der Nylonmembran	110
4.8.9	Detektion der ^3H -markierten rRNA mittels Autoradiographie	110
4.8.10	Northern-Hybridisierung mit einer ^{32}P -markierten Oligonukleotidsonde	110
4.9	Biochemische Methoden	112
4.9.1	Herstellung von Gesamtzellextrakten (WCEs)	112
4.9.2	Hefe-Aufschluss unter denaturierenden Bedingungen	112
4.9.3	Kern-Zytoplasma-Fraktionierung	113
4.9.4	Proteinbestimmung nach Bradford	114
4.9.5	Fällung von Proteinen	115
4.9.6	Western-Blot	115
4.9.7	Gelfiltrationschromatographie	119
4.9.8	Immunpräzipitationen (IPs)	120
4.10	Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP-Assays)	123
4.10.1	Crosslinking und Ernte der Hefekulturen	123
4.10.2	Zellaufschluss und Ultraschallbehandlung	123
4.10.3	Immunpräzipitation	124
4.10.4	Aufhebung des Crosslinks und Proteinase K-Behandlung	125
4.10.5	DNA-Fällung	125
4.10.6	Überprüfung der DNA-Fragmentlänge	126
4.10.7	Nachweis der Pol I-Rrn3p-Interaktion durch Chromatin-IPs	126
4.11	Immunfluoreszenzmikroskopie	127
4.11.1	Vorbereitung der Deckgläser	127
4.11.2	Fixierung der Hefezellen	127
4.11.3	Herstellung der Sphäroplasten	128
4.11.4	Immunlokalisation	128
4.12	Verwendete Computer-Software	129

5 ZUSAMMENFASSUNG 130

6 LITERATURVERZEICHNIS 132

1 EINLEITUNG

Ribosomen katalysieren in allen lebenden Zellen die Proteinsynthese, indem sie die zu translatierenden Messenger-RNAs (mRNAs) binden und die von den Transfer-RNAs (tRNAs) herantransportierten Aminosäuren zu den entsprechenden Polypeptiden verknüpfen. Die mehrere Megadalton großen Partikel bestehen aus über 50 verschiedenen Proteinen, den ribosomalen Proteinen, und mehreren ribosomalen RNAs (rRNAs). Diese sind in zwei Untereinheiten organisiert, welche in Eukaryoten aufgrund ihres Sedimentationsverhaltens als kleine 40S- und große 60S-Untereinheit bezeichnet werden. Die beiden Untereinheiten werden getrennt voneinander synthetisiert; erst bei der im Zytoplasma stattfindenden Proteinsynthese setzen sie sich zum katalytisch aktiven 80S-Ribosom zusammen (Strukturmodell in Abb. 1.1).

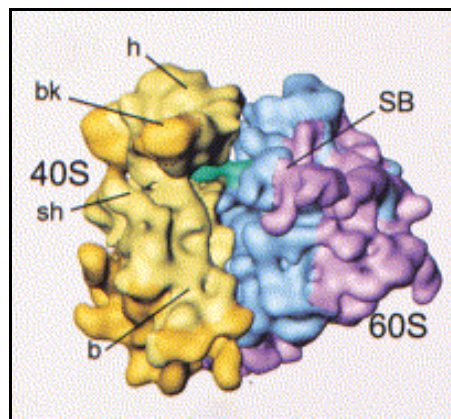


Abb. 1.1: Strukturmodell des 80S-Ribosoms der Hefe *S. cerevisiae* (aus Spahn et al., 2001). b: body, bk: beak, h: head, sh: shoulder, SB: stalk base.

Im 80S-Ribosom bindet die kleine Untereinheit die mRNA und die tRNAs, wohingegen die große Untereinheit für die Ausbildung der Peptidbindungen verantwortlich ist. Nach derzeitigem Kenntnisstand wird die Verknüpfung der Aminosäuren von den ribosomalen RNAs vermittelt. Die ribosomalen Proteine fungieren hingegen in erster Linie als strukturgebende Elemente; darüber hinaus sind einige ribosomale Proteine in die mRNA- und tRNA-Erkennung involviert (Übersicht in Brodersen und Nissen, 2005). Ferner werden zahlreiche ribosomale Proteine für die rRNA-Prozessierung benötigt (Ferreira-Cerca et al., 2005).

Sich teilende eukaryotische Zellen können mehrere Millionen translatierende 80S-Partikel enthalten, weswegen die Herstellung der Ribosomen als eine der größten Stoffwechselleistungen einer jeden Zelle angesehen werden muss. In Eukaryoten beginnt die Ribosomenbiogenese im Nukleolus, einem spezialisierten Bereich des Zellkerns. Hier synthetisiert die RNA-Polymerase I ein rRNA-Vorläufertranskript (Prä-rRNA), welches über verschiedene Zwischenstufen zu den reifen 28S/25S-, 18S- und 5,8S-rRNAs prozessiert wird. Während des Reifungsprozesses

assemblieren die ribosomalen Proteine, deren mRNAs von der RNA-Polymerase II hergestellt werden, an die rRNA-Vorläufer. Die RNA-Polymerase III steuert eine vierte ribosomale RNA bei, die 5S-rRNA. Die auf diese Weise entstehenden 40S- und 60S-Vorstufen werden nach Durchlaufen zahlreicher Prozessierungsschritte ins Zytoplasma exportiert, wo die abschließende Reifung zu den fertigen Untereinheiten stattfindet. Die Prozessierung der Vorläuferpartikel wird in Eukaryoten von zahlreichen nicht ribosomalen Proteinen und RNA-Molekülen bewerkstelligt, die zu bestimmten Zeitpunkten des Reifungsprozesses vorübergehend mit den Vorstufen wechselwirken. An der Herstellung dieser sog. Prozessierungsfaktoren ist wiederum die RNA-Polymerase II beteiligt (Übersicht in Kressler et al., 1999; Fatica und Tollervey, 2002; Tschochner und Hurt, 2003). Damit dienen rund 50 % der in einer proliferierenden Säugerzelle stattfindenden Transkriptionsereignisse der Ribosomensynthese; in exponentiell wachsenden Zellen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) sind es sogar bis zu 80 % (nach Moss und Stefanovsky, 2002).

Sowohl pro- als auch eukaryotische Zellen regulieren die Neusynthese ihrer Ribosomen in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen und anderen externen Faktoren. Während positive Wachstumssignale zu einer Aktivierung der Ribosomenproduktion führen, wird bei einem Wachstumsarrest die Synthese von rRNAs und ribosomalen Proteinen nahezu eingestellt (Warner, 1999). Darüber hinaus wird in Säugerzellen eine zellzyklusabhängige Regulation dieser Prozesse beobachtet (Russell und Zomerdijs, 2005). Ferner beeinflussen verschiedene Arten von Stress, virale Proteine, Hormone und Inhibitoren der Proteinsynthese die Herstellung neuer Ribosomen (Mayer und Grummt, 2005). Die folgenden Abschnitte befassen sich angesichts der Thematik dieser Arbeit in erster Linie mit der wachstumsabhängigen Regulation der rRNA-Synthese.

1.1 Der Nukleolus als Ort der rRNA-Synthese

In Eukaryoten finden die Prä-rRNA-Synthese durch die RNA-Polymerase I, ein Großteil der rRNA-Prozessierungsschritte sowie Zusammenbau und Prozessierung der präribosomalen Partikel im Nukleolus statt. Hierbei handelt es sich um einen speziellen Bereich des Zellkerns, der allerdings im Gegensatz zu anderen Zellorganellen nicht von einer Membran umgeben ist. Vielmehr hebt sich der Nukleolus bei licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen aufgrund seiner hohen Konzentration an RNA und Proteinen vom Nukleoplasma ab (Übersicht in Hernandez-Verdun, 2006).

Während die Zellen höherer Eukaryoten häufig mehrere kugelige Nukleoli enthalten, besitzen die Zellen der Hefe *S. cerevisiae* nur einen halbmondförmigen Nukleolus, der ca. 1/3 des Zellkerns einnimmt und Kontakt zur Kernmembran hat (Warner, 1990). Außerdem ist der Hefe-Nukleolus während des gesamten Zellzyklus vorhanden, wohingegen sich die Nukleoli von Säugetieren und Pflanzen zu Beginn der Mitose auflösen. Der Nukleolus kann aufgrund elektronenmikroskopischer Beobachtungen in drei morphologische Subdomänen unterteilt werden: das fibrilläre Zentrum (FC),

die dichte fibrilläre Komponente (DFC), die das FC teilweise oder vollständig umgibt, und die granuläre Komponente (GC), welche den restlichen Nukleolus ausfüllt (siehe Abb. 1.2). Meistens verfügt ein Nukleolus über mehrere von DFC umgebene fibrilläre Zentren (Leger-Silvestre et al., 1999; Übersicht und weitere Referenzen in Raska et al., 2004; Hernandez-Verdun, 2006; Raska et al., 2006).

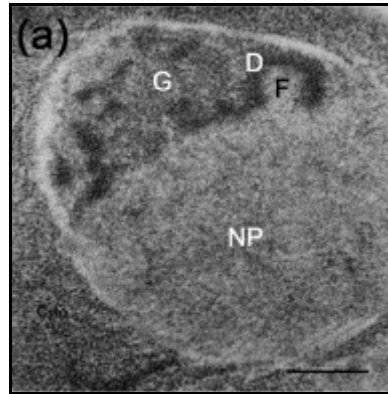


Abb. 1.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Zellkerns von *S. cerevisiae* (aus Raska et al., 2006). F: fibrilläres Zentrum, D: dichte fibrilläre Komponente, G: granuläre Komponente, NP: Nukleoplasma.

Seit mehr als 20 Jahren wird kontrovers diskutiert, in welchem der Kompartimente die RNA-Polymerase I die rRNA-Vorläufertranskripte herstellt. Da rRNA-Gene und RNA-Polymerase I-Moleküle zunächst nur im fibrillären Zentrum nachgewiesen wurden, wurde dieses anfänglich als Ort der RNA-Polymerase I-Transkription beschrieben. Heute geht man davon aus, dass sich im FC inaktive rRNA-Gene und RNA-Polymerase I-Moleküle befinden, während aktive Prä-rRNA-Synthese an der Grenze zwischen FC und DFC und in der DFC stattfindet (nach Raska et al., 2006). Des Weiteren scheinen in der dichten fibrillären Komponente die ersten rRNA-Prozessierungsschritte abzulaufen, denn in diesem Kompartiment konnten Proteine (z.B. Nop1p, Gar1p) und snoRNAs (z.B. U3, U14, MRP) nachgewiesen werden, die an der Methylierung, Pseudouridinylierung und Spaltung der Prä-rRNA beteiligt sind (Puvion-Dutilleul et al., 1991; Beven et al., 1996; Leger-Silvestre et al., 1999). Die granuläre Komponente (GC) enthält ribosomale Proteine und weitere Prozessierungsfaktoren; demnach assemblieren hier die ribosomalen Vorläuferpartikel, gleichzeitig finden in der GC weitere Prozessierungsschritte statt (nach Raska et al., 2006). Schließlich werden die präribosomalen Partikel ins Nukleoplasma abgegeben, wo Zusammenbau und Prozessierung fortgesetzt werden.

Die Größe des Nukleolus variiert mit der rRNA-Syntheserate (Moss und Stefanovsky, 2002). Bis vor einigen Jahren wurde die Auffassung vertreten, dass die Existenz des Nukleolus allein von der Aktivität der RNA-Polymerase I abhängt (Scheer und Weisenberger, 1994). Diese Hypothese basierte u.a. auf Arbeiten mit *S. cerevisiae*-Mutanten, in denen bei Inaktivierung der RNA-Polymerase I die Struktur des Nukleolus verloren ging (Oakes et al., 1993). Einige Jahre später wurde allerdings gezeigt, dass sich in Hefen auch dann eine Art Nukleolus ausbildet, wenn

die Prä-rRNA durch die RNA-Polymerase II synthetisiert wird (Oakes et al., 1998; Oakes et al., 1999). Daraufhin wurde postuliert, dass die morphologische Integrität des Nukleolus weniger von aktiver RNA-Polymerase I als vielmehr vom Vorhandensein der rRNA-Transkripte abhängt (Leger-Silvestre und Gas, 2004). Tatsächlich scheint die Situation aber noch komplexer zu sein, denn inzwischen wurden zwei *Xenopus*-Proteine beschrieben, die bei uneingeschränkter RNA-Polymerase I-Transkription die nukleoläre Struktur zerstören können (Gonda et al., 2003; Zusammenfassung in Raska et al., 2004).

Neben der Ribosomenbiogenese werden dem Nukleolus weitere Funktionen zugeschrieben. Verschiedenen Studien zufolge könnte er an der Entstehung der Signalerkennungspartikel (SRP) und der Telomerase-RNA sowie an der Prozessierung der U6-RNA, einer Komponente der Spleißosomen, beteiligt sein. Ferner scheint er eine Rolle beim Export einiger mRNAs aus dem Kern und bei der Prozessierung mehrerer tRNA-Vorläufer zu spielen (Zusammenfassung in Pederson, 1998). Daneben wurde der Nukleolus mit viraler Replikation, dem Alterungsprozess, der Zellzykluskontrolle, der Regulation von Tumorsuppressor- und Onkogenen sowie der Erkennung von zellulärem Stress in Verbindung gebracht (Olson et al., 2002; Olson, 2004).

1.2 Die genomische Organisation der rDNA

Das rRNA-Gen, welches für die von der RNA-Polymerase I transkribierte Prä-rRNA kodiert, liegt in den meisten eukaryotischen Zellen in hoher Kopienzahl vor. Die einzelnen Kopien sind nicht wahllos über das Genom verteilt, sondern bilden je nach Organismus ein oder mehrere Cluster, wobei die rRNA-Gen-Einheiten innerhalb eines Clusters tandemartig angeordnet sind.

Eine diploide menschliche Zelle besitzt ca. 400 rRNA-Gen-Wiederholungen, welche mehrere Cluster auf den kurzen Armen der fünf akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 formen. Die einzelnen rRNA-Gen-Cluster werden Nukleolus-Organisator-Regionen (NORs) genannt, da um sie herum die Nukleoli gebildet werden (nach Raska et al., 2004). Die Hefe *S. cerevisiae* verfügt über einen einzigen rRNA-Gen-Lokus, auch rDNA-Lokus genannt, der im Durchschnitt 150 Tandemwiederholungen des rRNA-Gens aufweist und auf Chromosom 12 lokalisiert ist. Aufgrund ungleicher meiotischer und mitotischer Rekombination kann die Kopienzahl zwischen 100 und 250 variieren. Der rDNA-Lokus stellt ca. 10 % des gesamten Hefegenoms dar (Warner, 1999). Wie die einzelnen rDNA-Wiederholungseinheiten in *S. cerevisiae* im Detail aufgebaut sind, kann Abb. 1.3 entnommen werden.

Die rDNA-Bereiche, die für die 18S-, 5,8S- und 25S-rRNA kodieren, sind durch zwei nicht kodierende Regionen voneinander getrennt, welche interne transkribierte Spacer (ITS1 und ITS2) genannt werden. Diese Anordnung wird von zwei externen transkribierten Spacern (5'-ETS und 3'-ETS) flankiert. Die genannten Elemente stellen den rDNA-Bereich dar, der von der RNA-Polymerase I transkribiert wird, nachdem diese an den rRNA-Gen-Promotor rekrutiert wurde. Dieser befindet sich unmittelbar stromaufwärts des 5'-ETS in einer nicht transkribierten Region

(NTS), welche die einzelnen rRNA-Gene jeweils voneinander trennt. Das von der RNA-Polymerase I synthetisierte Vorläufertranskript hat in der Hefe eine Größe von ca. 7 kb und wird aufgrund seines Sedimentationskoeffizienten 35S-prä-rRNA genannt. Am Ende der 3'-ETS liegen mehrere Terminationsstellen sowie ein Enhancer, der die rDNA-Transkription über eine große Distanz in beide Richtungen stimulieren kann. Unmittelbar 5'-wärts des rRNA-Gen-Promotors befindet sich ein weiteres Terminationselement (Übersicht in Kressler et al., 1999).

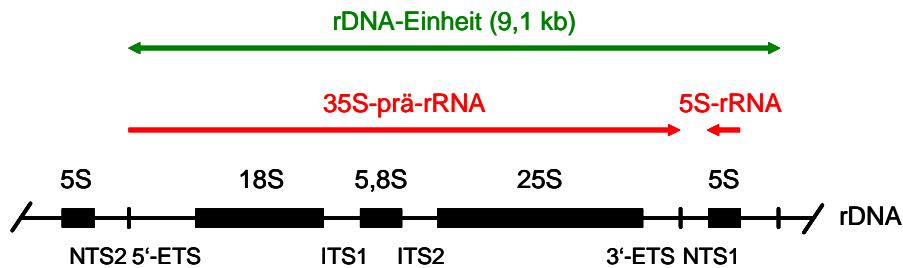


Abb. 1.3: Aufbau einer rDNA-Einheit in *S. cerevisiae* (Details im Text).

Verglichen mit anderen Eukaryoten verfügt die Hefe *S. cerevisiae* über eine Besonderheit hinsichtlich ihrer 5S-rRNA-Gene, welche von der RNA-Polymerase III transkribiert werden. Diese liegen in den nicht transkribierten Bereichen des rDNA-Lokus zwischen den einzelnen „35S-rDNA“-Einheiten und werden in entgegengesetzter Richtung zu diesen abgelesen. In höheren Eukaryoten sind die 5S-rRNA-Gene in eigenen Genclustern angeordnet.

Chromatinanalysen machten deutlich, dass niemals alle rRNA-Gene einer Zelle gleichzeitig transkribiert werden. rRNA-Synthese findet in der Regel nur an 50 % der Tandemwiederholungen statt. Verglichen mit den inaktiven rDNA-Bereichen zeichnen sich die transkribierten rRNA-Gene durch eine weniger kompakte Chromatinstruktur aus (Conconi et al., 1989; Dammann et al., 1993).

1.3 Initiation der RNA-Polymerase I-Transkription am rDNA-Promotor

Eukaryotische Zellen enthalten neben der RNA-Polymerase I noch zwei weitere kernständige RNA-Polymerasen, welche trotz einiger gemeinsamer Proteinuntereinheiten über klar voneinander abgegrenzte Funktionen verfügen. Während die RNA-Polymerase II für die Synthese der mRNAs (messenger RNAs), snoRNAs (small nucleolar RNAs), scaRNAs (small Cajal body RNAs) sowie der meisten snRNAs (small nuclear RNAs) verantwortlich ist und die bereits erwähnte RNA-Polymerase III neben den 5S-rRNA-Genen auch die tRNA (transfer RNA)- sowie einige kleine RNA-Gene transkribiert, synthetisiert die RNA-Polymerase I (Pol I) ausschließlich die Prä-rRNA, aus der die reifen 28S/25S-, 18S- und 5,8S-rRNAs hervorgehen (Paule und White, 2000; Kiss, 2004). Ferner zeichnen sich die drei eukaryotischen RNA-Polymerasen durch unterschiedliche biochemische Eigenschaften aus. So ist die RNA-Polymerase I im Vergleich zu den beiden anderen

Polymerasen unempfindlich gegenüber dem Pilzgift α -Amanitin. Ein weiteres wichtiges Differenzierungsmerkmal stellen die voneinander abweichenden basalen Transkriptionsmachinerien der drei eukaryotischen RNA-Polymerasen dar.

Um die Transkription am Promotor des jeweiligen Gens effizient initiieren zu können, benötigen eukaryotische RNA-Polymerasen im Gegensatz zum prokaryotischen Enzym sog. allgemeine (basale) Transkriptionsfaktoren. Erst nachdem diese in einer bestimmten Reihenfolge an spezifische Promotor-Sequenzen gebunden haben, kann auch die jeweilige Polymerase assoziieren und die Transkription starten. Der am Promotor entstehende Proteinkomplex wird Präinitiationskomplex (PIC) genannt. Interessanterweise ist das TATA-Bindeprotein TBP, welches an die TATA-Box zahlreicher RNA-Polymerase II-Promotoren bindet, auch in die Transkriptionsinitiation der RNA-Polymerasen I und III involviert (Cormack und Struhl, 1992; Schultz et al., 1992).

Hefen und Säuger nutzen zum Teil unterschiedliche basale Transkriptionsfaktoren, um die RNA-Polymerase I-Transkription zu initiieren. In den folgenden Abschnitten werden daher beide Systeme vorgestellt. Zunächst soll aber die Struktur des rRNA-Gen-Promotors beschrieben werden.

1.3.1 Die Struktur des rRNA-Gen-Promotors

Der rRNA-Gen-Promotor (vereinfacht: rDNA-Promotor) von Säugern, Amphibien und Hefen umfasst einen Bereich von ca. 150 bp und verfügt über zwei spezielle Sequenzelemente, mit denen die basalen Transkriptionsfaktoren der RNA-Polymerase I wechselwirken. Hierbei handelt es sich um das essenzielle Core-Element (CE), welches den Transkriptionsstartpunkt umgibt, und das 5'-wärts davon positionierte Upstream(-Control)-Element (UCE bzw. UE), das zwar nicht essenziell ist, aber für eine maximale Transkriptionsrate benötigt wird (nach Nomura, 1998; Moss und Stefanovsky, 2002). Verschiedene Gruppen, welche in erster Linie die Funktion der beiden Elemente untersuchten, bestimmten auch deren exakte Position auf der rDNA (Haltiner et al., 1986; Musters et al., 1989; Kulkens et al., 1991; Choe et al., 1992). Demnach umfasst in der Hefe *S. cerevisiae* das Core-Element den Bereich von +5 bis -38 relativ zum Transkriptionsstartpunkt, wohingegen sich das Upstream-Element von -60 bis -155 erstreckt (siehe Keener et al., 1998).

1.3.2 Der Präinitiationskomplex der RNA-Polymerase I höherer Eukaryoten

In Säugern enthält der Präinitiationskomplex der RNA-Polymerase I drei allgemeine Transkriptionsfaktoren, welche Upstream-Binding-Faktor (UBF), Promoter-Selectivity-Faktor (SL1/TIF-IB) und Rrn3/TIF-IA genannt werden. Während das HMG (high mobility group)-Box-Protein UBF in Form von Dimeren vorliegt, besteht SL1/TIF-IB aus dem TATA-Bindeprotein (TBP) und drei TBP-assoziierten Faktoren (TAF_I 95/110, TAF_I 68/63, TAF_I 48). Bei Rrn3/TIF-IA handelt es sich um ein monomeres Protein (Zusammenfassungen bei Moss und Stefanovsky, 2002; Grummt, 2003; Moss, 2004; Russell und Zomerdijs, 2005).

Nach derzeitigem Kenntnisstand lagert sich der Upstream-Binding-Faktor zuerst an den rDNA-Promotor an, wobei allerdings noch unklar ist, ob ein oder zwei UBF-Dimere die PIC-Bildung initiieren (siehe Abb. 1.4). Die einzelnen Dimere treten dabei sowohl mit dem Upstream- als auch mit dem Core-Promotorelement in Kontakt. Anschließend erfolgt die Bindung des Promoter-Selectivity-Faktors, dessen humane Form SL1 genannt wird, während seine murine Variante von Ingrid Grummt und Mitarbeitern als TIF-IB (Transkriptionsinitiationsfaktor-IB) bezeichnet wurde. Ebenso wie der UBF scheint SL1/TIF-IB beide Promotorelemente zu kontaktieren. Außerdem interagieren zwei Untereinheiten des Faktors (TBP und TAF_I 48) mit dem C-Terminus des UBF.

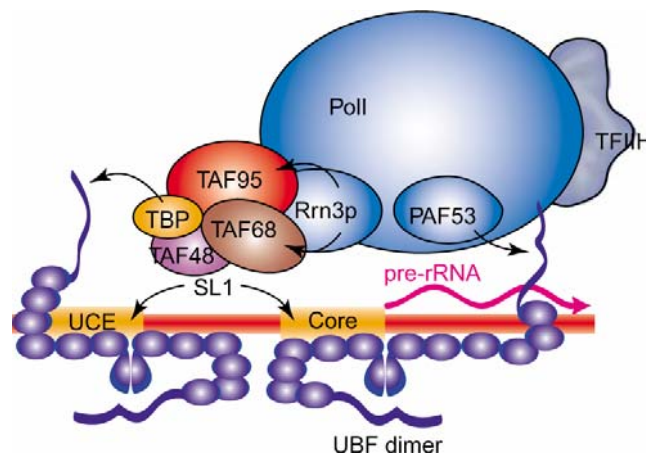


Abb. 1.4: Der Präinitiationskomplex der RNA-Polymerase I in höheren Eukaryoten (aus Moss, 2004). Nähere Erläuterungen zu den Komplexkomponenten UBF, SL1/TIF-IB und Rrn3/TIF-IA in diesem Kapitel, zu TF-IIIH in Kapitel 1.5.7; PAF53: Pol I-assoziiierter Faktor 53.

Nach dem Promoter-Selectivity-Faktor wird die RNA-Polymerase I an den rDNA-Promotor rekrutiert. Ein Pol I-Molekül kann allerdings nur dann in einen Präinitiationskomplex integriert werden, wenn es in seiner initiationskompetenten Form vorliegt, d.h. mit dem Transkriptionsinitiationsfaktor TIF-IA/Rrn3 assoziiert ist (Schnapp et al., 1990; Schnapp et al., 1993; Miller et al., 2001). TIF-IA wurde ursprünglich von I. Grummt und Mitarbeitern als Aktivität beschrieben, die in transkriptionsinaktiven Extrakten von konfluenten Mauszellen die rRNA-Synthese wiederherzustellen vermag (Buttgereit et al., 1985). Durch gleichzeitige Interaktion mit der Pol I-Untereinheit A43 und den SL1/TIF-IB-Komponenten TAF_I 63 und TAF_I 110 rekrutiert TIF-IA die Polymerase an den Transkriptionsstartpunkt (Yuan et al., 2002). Nach Meinung des Grummt-Labors umfasst der eukaryotische Präinitiationskomplex neben den drei genannten Faktoren und der RNA-Polymerase I noch eine weitere Aktivität. Das als TIF-IC bezeichnete Protein stimuliert im Maussystem zusätzlich zur Initiation auch die Pol I-Elongation (Schnapp et al., 1994).

Unmittelbar nach ihrer Rekrutierung beginnt die RNA-Polymerase I mit der rRNA-Synthese. Die initierende Polymerase verlässt den Promotor und geht in ihre elongierende Form über, was die Auflösung des PICs nach sich zieht. Beim Verlassen des Promotors dissoziiert Rrn3/TIF-IA von der

Polymerase ab und wird inaktiviert (Hirschler-Laszkiewicz et al., 2003). Es gibt Hinweise, dass SL1/TIF-IB und der UBF am rDNA-Promotor gebunden bleiben und so für eine neue Initiation zur Verfügung stehen (Panov et al., 2001).

1.3.3 Der Präinitiationskomplex der RNA-Polymerase I in der Hefe *S. cerevisiae*

Die basale Pol I-Transkriptionsmaschinerie der Hefe *S. cerevisiae* wurde zu einem großen Teil im Labor von Masayasu Nomura charakterisiert. Hier wurde Anfang der 90er Jahre ein genetischer Screen entwickelt, mit dessen Hilfe Hefemutanten isoliert werden konnten, die speziell einen Defekt in der RNA-Polymerase I-Transkription aufwiesen (Nogi et al., 1991a; Nogi et al., 1991b). Zur Durchführung des Screens wurde in einen Hefestamm mit intaktem endogenem rDNA-Lokus ein Plasmid eingeführt, welches zusätzlich die Synthese der 35S-prä-rRNA unter der Kontrolle des galaktoseabhängigen GAL7-Promotors durch die RNA-Polymerase II ermöglichte. Nach Mutagenisierung dieser Hefen wurde nach Klonen gesucht, die ohne Einschränkung auf Galaktose-Medium, nicht aber oder nur sehr schlecht auf glukosehaltigem Agar wuchsen. Dieser Phänotyp ließ sich nur durch Mutationen in Komponenten der RNA-Polymerase I-Transkriptionsmaschinerie erklären, welche in Gegenwart von Galaktose durch die RNA-Polymerase II-abhängige rRNA-Synthese supprimiert wurden.

Die bei diesem Screening isolierten *rrn*-Mutanten (*rrn* für defective in rRNA synthesis) wurden in 13 Komplementationgruppen eingeteilt (Nomura, 1998). Fünf der identifizierten Gene (RPA190, RPA135, RPA49, RPA43 und RPA12) kodieren für spezifische Untereinheiten der RNA-Polymerase I, die restlichen Gene (RRN3, RRN5, RRN6, RRN7, RRN9, RRN10 und RRN11) hingegen für Komponenten der so identifizierten basalen Pol I-Transkriptionsfaktoren Upstream-Activating-Faktor (UAF), Core-Faktor (CF) und Rrn3p. Der vierte allgemeine Transkriptionsfaktor der Pol I-Maschinerie, das TATA-Bindeprotein (TBP), konnte in dem oben beschriebenen Screen nicht gefunden werden, da er auch in die Transkriptionsinitiation der RNA-Polymerasen II und III involviert ist. In Abb. 1.5 ist der Präinitiationskomplex der Hefe *S. cerevisiae* schematisch dargestellt.

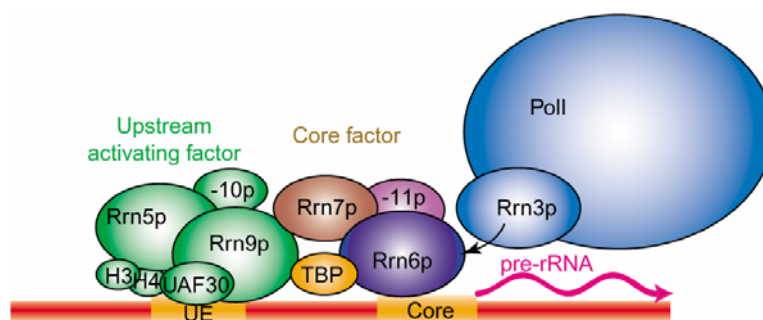


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des Pol I-Präinitiationskomplexes der Hefe *S. cerevisiae* (aus Moss, 2004). Details zu den einzelnen Komponenten im Text.

In *S. cerevisiae* beginnt der Zusammenbau des Präinitiationskomplexes mit der Anlagerung des UAF an das Upstream-Element des rDNA-Promotors (Übersicht in Nomura, 1998; Moss und Stefanovsky, 2002). Der UAF stellt einen Multiproteinkomplex bestehend aus sechs Untereinheiten dar: Während drei seiner Komponenten, Rrn5p, Rrn9p und Rrn10p, im Rahmen des zuvor beschriebenen Screens identifiziert wurden, wurden drei weitere Untereinheiten, die beiden Histone H3 und H4 sowie ein Protein namens Uaf30p, erst später entdeckt (Keys et al., 1996; Keener et al., 1997; Siddiqi et al., 2001). Keine der UAF-Untereinheiten weist Sequenzhomologien zum UBF auf, der in höheren Eukaryoten die PIC-Bildung initiiert. Die Gene RRN5, RRN9, RRN10 und UAF30 sind nicht essenziell für das Wachstum, ihre Deletion führt jedoch zu starken Wachstumsdefekten. Für die In-vitro-Rekonstitution der Pol I-Transkription ist der UAF ebenfalls nicht erforderlich, allerdings wird er für eine effiziente In-vitro-rRNA-Synthese benötigt (Keys et al., 1996). Interessanterweise findet in Hefestämmen, in denen die nicht essenziellen UAF-Gene disruptiert wurden, eine Expansion des rDNA-Lokus statt. In derartigen Stämmen übernimmt die RNA-Polymerase II die Transkription der rRNA-Gene, sodass die Hefen auch ohne Pol I-Transkription überleben können (Oakes et al., 1999; Vu et al., 1999; Siddiqi et al., 2001).

In *S. cerevisiae* ist das TATA-Bindeprotein TBP (Spt15p) nicht Bestandteil des Initiationsfaktors, der an das Core-Element bindet, sondern liegt zusammen mit dem UAF in einem stabilen Komplex von 240 kDa vor (Milkereit et al., 1997; Milkereit und Tschochner, 1998). Für eine basale In-vitro-rRNA-Synthese wird TBP nicht benötigt, dennoch scheint das Protein wie der UAF einen verstärkenden Effekt auf die Pol I-Transkription auszuüben. Eine maximale rRNA-Syntheserate wurde in vitro lediglich dann erreicht, wenn TBP, UAF und das Upstream-Promotorelement verfügbar waren (Steffan et al., 1996; Keener et al., 1998). Demnach ist davon auszugehen, dass der Core-Faktor und die initiationskompetente RNA-Polymerase I nur dann effizient an den Transkriptionsstartpunkt rekrutiert werden, wenn der UAF-TBP-Komplex stabil mit dem rDNA-Promotor assoziiert ist (Steffan et al., 1996; Steffan et al., 1998).

Der Core-Faktor (CF), der an das Core-Element des rDNA-Promotors bindet, besteht aus drei Untereinheiten, die von den Genen RRN6, RRN7 und RRN11 kodiert werden. Alle drei Gene sind für das Hefewachstum essenziell (Keys et al., 1994; Lalo et al., 1996). Ein minimales System, bestehend aus dem Core-Element, dem Core-Faktor und initiationskompetenter Polymerase reicht in vitro für eine basale Pol I-Transkription aus (Keener et al., 1998). Ohne CF findet in vitro, auch wenn alle anderen benötigten Faktoren und DNA-Elemente vorhanden sind, keine rRNA-Synthese statt; folglich ist der Core-Faktor nicht nur in vivo sondern auch in vitro essenziell für die Initiation der RNA-Polymerase I-Transkription (Keys et al., 1994). Obwohl TBP gewöhnlich nicht zusammen mit dem CF aufgereinigt wird, interagieren beide Faktoren innerhalb des Präinitiationskomplexes miteinander. Indem TBP sowohl mit der Rrn6p-Untereinheit des CFs als auch mit der UAF-Komponente Rrn9p wechselwirkt (Steffan et al., 1996), entsteht am rDNA-Promotor ein stabiler Proteinkomplex, ohne den die initiationskompetente RNA-Polymerase I nicht rekrutiert werden kann. Die CF-Komponenten weisen keine Sequenzhomologien zu den TAFs des Selectivity-Faktors SL1 auf.

Ebenso wie in Säugern wird auch in der Hefe ein Pol I-Molekül nur dann in den PIC integriert, wenn es im Komplex mit dem essenziellen Transkriptionsfaktor Rrn3p vorliegt (Yamamoto et al., 1996; Milkereit und Tschochner, 1998). Auf Proteinebene weist das aus 627 Aminosäuren aufgebaute, ca. 72 kDa große Rrn3p ein hohes Maß an Sequenzhomologie zu dem Säugerprotein TIF-IA auf (Bodem et al., 2000; Moorefield et al., 2000). Durch gleichzeitige Interaktion mit der Pol I-Untereinheit A43 und der Core-Faktor-Komponente Rrn6p rekrutiert Rrn3p die Polymerase an den rDNA-Promotor (Peyroche et al., 2000).

Die RNA-Polymerase I setzt sich in *S. cerevisiae* aus insgesamt 14 Proteinen zusammen, wovon sieben (A190, A135, A49, A43, A34.5, A14, A12.2) Pol I-spezifische Untereinheiten darstellen. AC19 und AC40 sind auch Bestandteil der RNA-Polymerase III, die restlichen fünf Untereinheiten (ABC27, ABC23, ABC14.5, ABC10 α , ABC10 β) kommen in allen drei Hefe-RNA-Polymerasen vor (Übersicht in Carles und Riva, 1998). Die meisten Pol I-Komponenten sind essenziell für das Wachstum, Ausnahmen bilden die Proteine A49, A34.5, A14 und A12.2. Mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen konnten ein dreidimensionales Modell der RNA-Polymerase I-Struktur erstellt und die Position verschiedener Untereinheiten im Gesamtmolekül bestimmt werden (Schultz et al., 1993; Klinger et al., 1996; Bischler et al., 1998; Bischler et al., 2002).

Unmittelbar nach dem Transkriptionsstart dissoziiert auch das Hefe-Rrn3p von der RNA-Polymerase I ab, welche daraufhin in ihre elongierende Form übergeht (Milkereit und Tschochner, 1998; Bier et al., 2004). In-vitro-Experimente mit einem immobilisierten rDNA-Template zeigten, dass TBP und der Core-Faktor nach erfolgter Transkriptionsinitiation ebenfalls den rDNA-Promotor verlassen, lediglich der UAF blieb unter den gewählten Bedingungen stabil mit der rDNA assoziiert. Demnach besteht die Möglichkeit, dass in *S. cerevisiae* sowohl der Pol I-Rrn3p-Komplex als auch der CF und TBP für jede Transkriptionsinitiation am Promotor neu binden (Aprikian et al., 2001).

1.4 Termination der RNA-Polymerase I-Transkription

Zwar wurden in letzter Zeit einige Faktoren beschrieben, die in die Regulation der RNA-Polymerase I-Elongation involviert sein könnten (siehe Kap. 1.5.6 und 1.5.7), doch wurde bislang noch keines dieser Proteine als Pol I-Elongationsfaktor im eigentlichen Sinn definiert. Im Gegensatz dazu werden sowohl ein Hefe- als auch ein Säugerprotein als Pol I-Terminationsfaktoren eingestuft.

Jede rDNA-Wiederholungseinheit verfügt über zwei Bereiche mit Terminationsstellen. Zum einen befinden sich mehrere aufeinanderfolgende Terminatoren stromabwärts der Region, die für die 28S/25S-rRNA kodiert, am Ende des 3'-ETS. In *S. cerevisiae* überlappt dieser Bereich mit dem Enhancer. Ein weiteres einzelnes Terminationselement liegt kurz vor dem rDNA-Promotor, in der Hefe etwa bei Position -210 relativ zum Transkriptionsstartpunkt. Beide Terminatorbereiche

zeichnen sich durch eine Protein-Bindestelle aus, im 3'-ETS befindet sich zusätzlich eine T-reiche Sequenz (Übersicht in Reeder und Lang, 1998).

In *S. cerevisiae* stellt das erstgenannte Element (+105 bis +112 relativ zum 3'-Ende der 25S-rRNA kodierenden Region) eine Bindestelle für das essenzielle, relativ abundante Protein Reb1p dar. Dieses besitzt in seiner C-terminalen Hälfte eine zweigeteilte DNA-Bindedomäne, welche spezifisch mit der DNA-Sequenz CCGGGTA interagiert, die nicht nur in der rDNA, sondern auch in einigen RNA-Polymerase II-Promotoren vorkommt. Nach einem von Reeder und Lang vorgeschlagenen, auf In-vitro-Daten basierenden Modell führt die Assoziation von Reb1p mit seiner Bindestelle im Pol I-Terminator dazu, dass die Transkription ca. 95 bp stromabwärts vom 3'-Ende der 25S-rRNA kodierenden Region pausiert. Anschließend ermöglicht das 5'-wärts von der Reb1p-Bindestelle liegende T-reiche Element die Dissoziation des Transkripts und der Polymerase vom DNA-Template. Das endgültige 3'-Ende der 35S-prä-rRNA wird danach durch Prozessierung erzeugt (Lang et al., 1994; Lang und Reeder, 1995). Daten des Planta-Labors sprechen hingegen dafür, dass in vivo die RNA-Polymerase I-Transkription auch an anderen Stellen terminiert werden kann (van der Sande et al., 1989).

Im Maussystem bindet das Protein TTF-I (Transkriptionsterminationsfaktor-I) an den Pol I-Terminator (Bartsch et al., 1988), wodurch die DNA im Bereich der Terminationsstelle verbogen und die RNA-Polymerase angehalten wird. In der Folge induzieren dann die T-reiche Sequenz und ein weiterer Faktor namens PTRF (polymerase and transcript release factor) das Ablösen der Polymerase und des Transkripts von der DNA (Jansa und Grummt, 1999; Übersicht in Russell und Zomerdijs, 2005). In *S. cerevisiae* konnte bislang noch kein spezifischer Release-Faktor identifiziert werden, obwohl gezeigt wurde, dass ein solcher Faktor für die Pol I-Termination benötigt wird (Tschochne und Milkereit, 1997). Reb1p und TTF-I binden auch an das Terminationselement, das unmittelbar 5'-wärts vom rDNA-Promotor liegt. In der Hefe und in Säugern resultiert daraus eine Aktivierung der Transkriptionsinitiation (Zusammenfassung in Paule und White, 2000).

1.5 Regulation der RNA-Polymerase I-Transkription

Das Überleben aller pro- und eukaryotischen Zellen hängt von ihrer Fähigkeit ab, die Ribosomenbiogenese in Reaktion auf unterschiedliche externe Stimuli schnell aktivieren bzw. reprimieren zu können. So werden beispielsweise Zellteilungsschritte nur dann eingeleitet, wenn genügend neue Ribosomen hergestellt wurden. Bei einem Wachstumsstopp stellen Zellen ihre Ribosomenproduktion hingegen sofort ein, um nicht unnötig Energie zu vergeuden. Umgekehrt entarten Zellen, die ihre Ribosomensynthese nicht mehr kontrollieren können, häufig zu Tumorzellen (nach White, 2005). Zellwachstum und -proliferation hängen demnach von einer präzise regulierten Ribosomenbiogenese ab. Der Regulation der RNA-Polymerase I (Pol I)-vermittelten rRNA-Synthese kommt dabei eine besondere Bedeutung zu, da die rRNAs im

Gegensatz zu den ribosomalen Proteinen nicht im Überschuss hergestellt werden und somit beim Zusammenbau der Ribosomen die limitierenden Komponenten darstellen.

Seit langem ist bekannt, dass die Wachstumsbedingungen einen direkten Einfluss auf die rDNA-Transkription ausüben (Übersicht in Grummt, 1999). Maximale Pol I-Transkriptionsraten werden lediglich von Zellen erreicht, die sich bei optimalem Nährstoffangebot in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Im Gegensatz dazu stellen stationäre Zellen keine rRNA mehr her (Ju und Warner, 1994). Ebenso führt ein Mangel an wichtigen Wachstumsfaktoren oder Nährstoffen, wie er beispielsweise durch Serumentzug oder Aminosäuredepletion induziert werden kann, zu einer sofortigen Inhibition der Pol I-Transkription (Grummt et al., 1976; Grummt et al., 1977). Der gleiche Effekt kann durch Behandlung eukaryotischer Zellen mit Rapamycin, einem spezifischen Inhibitor der für das Wachstum essenziellen Tor (target of rapamycin)-Kinase(n), erzielt werden (Zaragoza et al., 1998; Powers und Walter, 1999). Darüber hinaus reagiert die rDNA-Transkription auf Virusinfektionen, verschiedene Arten von Stress und Hormone sowie auf Reagenzien, die die Proteinsynthese inhibieren (Übersicht in Jacob, 1995; Grummt, 1999; Mayer und Grummt, 2005). Außerdem wird die rRNA-Synthese in höheren Eukaryoten zellzyklusabhängig reguliert, denn Pol I-Transkripte werden in Säugerzellen nur in der Interphase, nicht aber während der Mitose hergestellt (Zusammenfassung in Russell und Zomerdijs, 2005). Angesichts der Thematik dieser Arbeit wird in den folgenden Abschnitten vorrangig auf die wachstumsabhängige Regulation der Pol I-Transkription eingegangen.

1.5.1 Regulation der rDNA-Transkription auf Chromatinebene

Die wachstumsabhängige Regulation der rRNA-Synthese kann auf zwei Ebenen erfolgen: zum einen über die Anzahl der aktiven rRNA-Gene und zum anderen über die Transkriptionsrate pro aktivem Gen (Übersicht in Russell und Zomerdijs, 2005).

Wie bereits angedeutet wird in wachsenden eukaryotischen Zellen nur etwa die Hälfte der vorhandenen rRNA-Gene auch tatsächlich transkribiert. Mittels Psoralen-Crosslinking-Studien und elektronenmikroskopischer Analysen sog. Miller-rDNA-Chromatinspreads (kurz Miller-Spreads) können diese aktiven von den inaktiven rDNA-Einheiten unterschieden werden (Dammann et al., 1993; French et al., 2003). Die inaktiven Gene können aufgrund einer kompakten Chromatinstruktur, die an Heterochromatin erinnert, nicht transkribiert werden (geschlossene rDNA-Einheiten). Die aktiven Gene verfügen dagegen über weniger dichtes (Eu-)Chromatin (offene rDNA-Einheiten). Die dauerhafte (epigenetische) Inaktivierung von rRNA-Genen wird in Säugern durch den nukleolären Chromatin-Remodeling-Komplex NoRC vermittelt. Dieser wird durch Interaktion mit dem unmittelbar vor dem rRNA-Gen-Promotor gebundenen Terminationsfaktor TTF-I an die rDNA gebracht. Indem NoRC histonmodifizierende Enzyme und DNA-Methyltransferasen rekrutiert, können im Promotorbereich transkriptionsinhibierende Histon-Deacetylierungen und DNA-Methylierungen stattfinden. Außerdem induziert der NoRC-Komplex

eine Nukleosomenverschiebung in Richtung Transkriptionsstartpunkt, was die rDNA-Transkription ebenfalls verhindert (Zusammenfassung und weitere Referenzen in Li et al., 2006b).

Neben diesen epigenetischen werden in *S. cerevisiae* weitere wachstumsabhängige rRNA-Gen-Inaktivierungen beobachtet. Im Gegensatz zu exponentiell wachsenden Hefezellen, in denen 50 % der rDNA-Einheiten aktiv transkribiert werden, weisen stationäre Hefen deutlich weniger offene Wiederholungen auf (Dammann et al., 1993). Sandmeier und Kollegen behaupten, dass die Histondeacetylase Rpd3p für die Inaktivierung einzelner rDNA-Einheiten in der stationären Phase verantwortlich sei, denn bei ihren Untersuchungen blieb in einer rpd3A-Mutante die Anzahl der offenen rRNA-Gene beim Eintritt in die stationäre Phase etwa gleich. Trotzdem wurde die rDNA-Transkription deutlich reprimiert, was vermuten lässt, dass die Inhibition der rRNA-Synthese in stationären Hefezellen sowohl auf die Inaktivierung einzelner rDNA-Einheiten als auch auf eine verminderte rRNA-Syntheserate an den noch offenen Genen zurückzuführen ist (Sandmeier et al., 2002). In konfluenten Säugerzellen bleibt das Verhältnis von offenen zu geschlossenen rRNA-Genen hingegen unverändert (Conconi et al., 1989). Hier wird die rRNA-Synthese ausschließlich über die Transkriptionsrate an den offenen Genen reguliert.

1.5.2 Die Bedeutung des RNA-Polymerase I-Rrn3-Komplexes für die wachstumsabhängige Regulation der rRNA-Synthese

In eukaryotischen Zellen existieren zwei verschiedene RNA-Polymerase I-Populationen. Beide können in vitro RNA unspezifisch synthetisieren, doch nur eine Form ist in der Lage, die Transkription promotorabhängig zu initiieren. Diese beiden unterschiedlichen Pol I-Populationen wurden in *Acanthamoeba castellanii* (Stevens und Pachler, 1973; Bateman und Paule, 1986), in Mauszelllinien (Tower und Sollner-Webb, 1987), in *S. cerevisiae* (Milkereit et al., 1997) und in HeLa-Zellen (Miller et al., 2001) nachgewiesen. Interessanterweise wird die initiationskompetente Form ausschließlich in wachsenden Zellen gefunden. Sobald *Acanthamoeba*-, Maus- und Hefezellen die stationäre Phase erreichen, geht die initiationsaktive Pol I-Population verloren (Bateman und Paule, 1986; Tower und Sollner-Webb, 1987; Milkereit und Tschochner, 1998). In Säugerzellen, die durch Serumentzug, Aminosäuredepletion oder Cycloheximidbehandlung am Wachstum gehindert werden, ist diese ebenfalls nicht mehr nachweisbar (Buttgereit et al., 1985; Schnapp et al., 1990; Yuan et al., 2002).

Wie in Kapitel 1.3 bereits angedeutet wurde, zeichnet sich die initiationskompetente Form der RNA-Polymerase I dadurch aus, dass sie in einem stabilen Komplex mit dem Transkriptionsfaktor Rrn3p/TIF-IA/hRrn3 vorliegt (Milkereit und Tschochner, 1998; Miller et al., 2001; Yuan et al., 2002). Aus den Arbeiten des Tschochner-Labors ging hervor, dass in wachsenden Hefezellen nur ca. 2 % aller RNA-Polymerase I-Moleküle mit Rrn3p assoziiert sind (Milkereit und Tschochner, 1998). Beim Rest handelt es sich um elongierende Polymerase sowie um transkriptionsinaktive Monomere und Dimere, welche nicht mit der rDNA interagieren (Milkereit et al., 1997). In stationären Hefen konnten zwar freie Polymerase-Moleküle und freies Rrn3p aber keine Pol I-

Rrn3p-Komplexe nachgewiesen werden (Milkereit und Tschochner, 1998). Wenn in Hefen durch Rapamycinbehandlung die für das Wachstum essenziellen Tor-Kinasen inhibiert werden, verringert sich die Menge der Pol I-Rrn3p-Komplexe ebenfalls (Claypool et al., 2004). Demnach scheint in *S. cerevisiae* die rDNA-Transkription von der Komplexbildung zwischen der RNA-Polymerase I und Rrn3p abzuhängen.

In Säugern verhält sich die Situation ähnlich, Extrakte von wachsenden Zellen enthalten eine mit TIF-IA bzw. hRrn3 assoziierte Pol I-Population und können somit die Transkription promotorabhängig initiieren, wohingegen Extrakte von wachstumsarretierten Zellen weder den Komplex noch spezifische Initiationsaktivität aufweisen (Miller et al., 2001; Yuan et al., 2002). Allerdings scheint die rDNA-Transkription in höheren Eukaryoten weniger von der Komplexbildung an sich abzuhängen als von der Aktivität des Transkriptionsfaktors Rrn3/TIF-IA. Bereits vor 20 Jahren konnten I. Grummt und Mitarbeiter TIF-IA-Aktivität nur in wachsenden, nicht aber in wachstumsarretierten Zellen nachweisen (Buttgereit et al., 1985). Die anderen Komponenten des Präinitiationskomplexes werden im Maussystem offensichtlich nicht wachstumsabhängig reguliert, denn transkriptionsinaktive Mauszelleextrakte müssen lediglich mit aktivem TIF-IA versetzt werden, um wieder initiieren zu können (Buttgereit et al., 1985; Yuan et al., 2002). Im Hefesystem wird hierzu der Pol I-Rrn3p-Komplex aus wachsenden Zellen benötigt, mit aktivem Rrn3p allein kann die Transkription nicht wiederhergestellt werden (Milkereit und Tschochner, 1998).

1.5.3 Der RNA-Polymerase I-Rrn3p-Komplex in der Hefe *S. cerevisiae*

Nachdem die Bedeutung des Pol I-Rrn3p/TIF-IA-Komplexes für die Regulation der rDNA-Transkription erkannt worden war, wurde der Frage nachgegangen, wie die Komplexbildung an sich moduliert wird. Sehr schnell wurde klar, dass Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen dabei eine entscheidende Rolle spielen.

Seit mehr als 20 Jahren ist bekannt, dass die RNA-Polymerase I der Hefe *S. cerevisiae* über fünf phosphorylierte Untereinheiten (A190, A43, A34.5, ABC23, AC19) verfügt (Bell et al., 1976; Buhler et al., 1976; Bell et al., 1977; Breant et al., 1983). Auch Rrn3p wurde von Fath und Kollegen als Phosphoprotein identifiziert (Fath et al., 2001). Aus der gleichen Studie geht hervor, dass die Hefe-Polymerase prinzipiell phosphoryliert sein muss, um Rrn3p in vitro binden zu können. Im Gegensatz dazu scheint Rrn3p keine Phosphorylierungen aufweisen zu müssen, um mit der Polymerase in vitro einen initiationskompetenten Komplex ausbilden zu können. In vivo ist das freie Rrn3p stärker phosphoryliert als das mit der Polymerase assoziierte Protein. Auch bei der Polymerase wurden unterschiedliche Phosphorylierungsmuster beobachtet. Während das mit Rrn3p interagierende Enzym zahlreiche Phosphorylierungen an der A43-Untereinheit aufweist, zeichnet sich die Gesamtpopulation durch eine schwächer phosphorylierte A43- und eine stärker phosphorylierte A190-Untereinheit aus (Fath et al., 2001). Demnach scheinen in *S. cerevisiae* ganz bestimmte Pol I-Phosphorylierungen dazu beizutragen, dass das Enzym mit Rrn3p interagieren und

die Transkription am rDNA-Promotor initiieren kann; bislang konnten aber weder die genauen Phosphorylierungsstellen noch die für ihre Modifizierung verantwortlichen Kinasen und Phosphatasen identifiziert werden.

1.5.4 Bedeutung des Initiationsfaktors TIF-IA für die Regulation der RNA-Polymerase I-Transkription in Säugern

In Säugern scheint die Bildung des initiationskompetenten Pol I-Rrn3/TIF-IA-Komplexes weniger von der Polymerase als vom Phosphorylierungszustand des Rrn3/TIF-IA abzuhängen. Wie das Rothblum-Labor anhand von In-vitro-Experimenten zeigen konnte, kann im Nagersystem lediglich phosphoryliertes Rrn3 mit der Polymerase einen initiationsaktiven Komplex ausbilden. Unmittelbar nach der Initiation wird der Faktor desphosphoryliert, dissoziiert von der Polymerase ab und ist danach nicht mehr in der Lage, erneut mit einem Polymerase-Molekül zu interagieren, um die Transkription zu reinitiiieren (Cavanaugh et al., 2002; Hirschler-Laszkiewicz et al., 2003). Nachdem das Grummt-Labor bereits vor 20 Jahren gezeigt hatte, dass die Rrn3/TIF-IA-Aktivität vom Wachstumszustand der Zellen abhängt (Buttgereit et al., 1985), wurde in der Folge nach Signaltransduktionswegen gesucht, welche die Wachstumssignale von der Zelloberfläche auf den Faktor übertragen. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden zahlreiche Phosphorylierungsstellen des TIF-IA identifiziert (Schlosser et al., 2002; Zhao et al., 2003; Mayer et al., 2004).

Von den verschiedenen Signalmolekülen, welche positive Wachstumssignale weiterleiten, wurden die beiden Kinasen MAPK/ERK und mTOR mit der Regulation der TIF-IA-Aktivität in Verbindung gebracht. Zhao et al. demonstrierten, dass Wachstumsfaktoren wie der im Serum vorkommende EGF (epidermal growth factor) die rRNA-Synthese stimulieren, indem sie die MAP-Kinasen ERK1/2 (extracellular signal regulated kinases 1/2) aktivieren, was wiederum zu einer Aktivierung der Kinase RSK2 (ribosomal S6 kinase 2) führt. Sowohl ERK1/2 als auch RSK2 phosphorylieren daraufhin TIF-IA an jeweils einem ganz bestimmten Serinrest (S633 und S649), was eine Aktivierung des Faktors zur Folge hat und die rRNA-Synthese stimuliert (Zhao et al., 2003).

Neben den MAP-Kinasen kontrolliert die mTOR (mammalian target of rapamycin)-Kinase das Wachstum von Säugerzellen. Diese ist nur bei günstigem Nährstoffangebot aktiv. Nährstoffmangel oder Rapamycinbehandlung führen hingegen zu einer Inaktivierung von mTOR und in der Folge zu einer Inhibition der von ihr regulierten zellulären Prozesse, wozu u.a. die rDNA-Transkription zählt. Wie die unterschiedlichen Wachstumssignale auf die TOR-Kinase übertragen werden, ist noch unbekannt, allerdings konnten bereits wichtige Downstream-Effektoren der mTOR-Signalkaskade, wie beispielsweise S6K1 (p70 ribosomal S6 kinase 1) identifiziert werden. Mayer und Kollegen stellten fest, dass die durch Rapamycinbehandlung ausgelöste Inhibition der Pol I-Transkription mit einer Inaktivierung des TIF-IA und der Dissoziation des Pol I-TIF-IA-Komplexes korreliert. Sowohl aufgereinigte mTOR-Kinase als auch S6K1 konnten die rRNA-Synthese in transkriptionsinaktiven Extrakten von rapamycinbehandelten Zellen wiederherstellen. Eine direkte

Phosphorylierung des TIF-IA durch mTOR oder S6K1 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Allerdings wurde nach Inaktivierung des TOR-Signalwegs eine verminderte Phosphorylierung am Serinrest 44 des TIF-IA sowie eine Hyperphosphorylierung von S199 beobachtet, wobei die S44-Phosphorylierung möglicherweise von einer zyklinabhängigen Kinase (Cdk2-Cyclin E) mediert wird und für die TIF-IA-Funktion essenziell zu sein scheint (Mayer et al., 2004). Die Mayer-Daten stehen im Widerspruch zu Ergebnissen von anderen Gruppen, die ebenfalls die Bedeutung des mTOR-Signalweges für die Pol I-Transkription erforschten. In einer von Hannan und Kollegen publizierten Studie wird nicht Rrn3 sondern der Upstream-Binding-Faktor UBF als Downstream-Effektor von mTOR und S6K1 präsentiert. Eine Rrn3-Inaktivierung infolge Rapamycinbehandlung konnte im Rahmen dieser Untersuchung nicht festgestellt werden, vielmehr wurden bei Inhibition des TOR-Signalwegs in serumaktivierten NIH3T3-Zellen eine verminderte UBF-Expression sowie eine Dephosphorylierung seines C-Terminus beobachtet (Hannan et al., 2003).

Nach Auffassung des Grummt-Labors werden nicht nur positive, sondern auch negative Wachstumssignale über Rrn3/TIF-IA mediert. Denn offensichtlich kann die bei verschiedenen Arten von zellulärem Stress aktivierte MAP-Kinase JNK (c-Jun N-terminal kinase) TIF-IA am Threoninrest 200 phosphorylieren, was eine Inaktivierung des Faktors, die Dissoziation des Präinitiationskomplexes sowie eine Inhibition der rRNA-Synthese zur Folge hat (Mayer et al., 2005).

1.5.5 Bedeutung der anderen basalen Initiationsfaktoren für die Regulation der RNA-Polymerase I-Transkription

Zahlreiche Veröffentlichungen belegen, dass im Säugersystem nicht nur Rrn3/TIF-IA, sondern auch der Upstream-Binding-Faktor und der Selectivity-Faktor/TIF-IB in die Regulation der RNA-Polymerase I-Transkription involviert sind (Übersicht in Russell und Zomerdijs, 2005).

Wie bereits erwähnt wird in serumstimulierten NIH3T3-Zellen der C-Terminus des UBF mTOR- und S6K1-abhängig phosphoryliert, was zu einer verstärkten SL1-Rekrutierung führt und eine Aktivierung der RNA-Polymerase I-Transkription bewirkt (Tuan et al., 1999; Hannan et al., 2003). Darüber hinaus findet in serumstimulierten Zellen eine ERK (extracellular signal regulated kinase)-abhängige UBF-Phosphorylierung statt. Indem die MAP-Kinase zwei N-terminale Serinreste (S117 und S201) des Faktors phosphoryliert, wird die rRNA-Synthese ebenfalls stimuliert (Stefanovsky et al., 2001b). Panova et al. fanden heraus, dass in HeLa-Zellen die initiationskompetente Form der RNA-Polymerase I mit der Caseinkinase 2 (CK2) assoziiert ist. Diese ist in der Lage, sowohl den UBF als auch die SL1-Untereinheit TAF_I 110 zu phosphorylieren, wobei die SL1-Phosphorylierung im Gegensatz zur UBF-Phosphorylierung einen inhibitorischen Effekt auf die Pol I-Transkription ausübt (Panova et al., 2006).

Neben den oben erwähnten Kinasen scheinen auch Acetyltransferasen und Deacetylasen in die Regulation der rRNA-Synthese involviert zu sein. Eine durch PCAF (p300/CBP-associated factor) katalysierte Acetylierung der SL1-Untereinheit TAF_I 68 verstärkt dessen Bindung an den rDNA-Promotor und bewirkt in vitro eine Stimulierung der Pol I-Transkription (Muth et al., 2001). Des Weiteren wurde eine CBP (CREB binding protein)-abhängige Acetylierung des UBF beobachtet, die sich ebenfalls aktivierend auf die In-vitro-rRNA-Synthese auswirkt (Pelletier et al., 2000).

1.5.6 Regulation der RNA-Polymerase I-Transkription auf Elongationsebene

Bis vor kurzem ließen die Publikationen zur RNA-Polymerase I-Transkription vermuten, dass diese ausschließlich auf der Ebene der Initiation reguliert wird. Neuere Daten belegen jedoch, dass auch das elongierende Enzym einer Regulation unterliegen könnte.

Im Jahr 2006 schlussfolgerten Stefanovsky und Kollegen aus ihren Daten, dass die in serumstimulierten NIH3T3-Zellen beobachtete Aktivierung der rRNA-Synthese nicht auf eine verstärkte Transkriptionsinitiation sondern auf eine bis zu 5-fach gesteigerte Pol I-Elongationsrate zurückzuführen ist (Stefanovsky et al., 2006a). Nach Auffassung der Autoren wird dabei nicht die Polymerase selbst moduliert, vielmehr scheint die Regulation über den Upstream-Binding-Faktor (UBF) mediert zu werden. In Säugerzellen und *Xenopus*-Oozyten bindet das HMG (high mobility group)-Box-Protein UBF nicht nur an den Promotor der rRNA-Gene, sondern an die gesamte rDNA (O'Sullivan et al., 2002). Infolge der UBF-Anlagerung werden die rRNA-Gene in sog. Enhancesomen, die in ihrer Struktur an Nukleosomen erinnern, verpackt (Stefanovsky et al., 1996; Stefanovsky et al., 2001a). Dieses rDNA-spezifische Chromatin bildet sich allerdings nur nach Serumentzug in nicht wachsenden Zellen aus, in denen der UBF in seiner nicht phosphorylierten Form vorliegt. Nach einem von Tom Moss und Kollegen vorgeschlagenen Modell (siehe Stefanovsky et al., 2006a) blockieren in arretierten Säugerzellen die unphosphorylierten, in Enhancesomen organisierten UBF-Moleküle die Pol I-Elongation. Werden die Zellen jedoch mit Serum oder Wachstumsfaktoren stimuliert, kommt es zu einer Aktivierung der MAP-Kinase ERK (extracellular signal regulated kinase), die daraufhin wie bereits erwähnt zwei Serinreste (S117 und S201) in den HMG-Boxen 1 und 2 des UBF phosphoryliert (Stefanovsky et al., 2001b). Dies wiederum führt zu einer Auflockerung der aus Enhancesomen bestehenden Chromatinstruktur (Stefanovsky et al., 2006b), sodass die mit den rRNA-Genen assoziierten Polymerase-Moleküle mit der Elongation fortfahren können.

In *S. cerevisiae* konnte eine derartige Elongationsregulation bislang nicht nachgewiesen werden, obwohl inzwischen einige Hefepoteine beschrieben wurden, die offensichtlich erst im Anschluss an die Initiation in die Regulation der RNA-Polymerase I-Transkription eingreifen (siehe nächstes Kapitel).

1.5.7 Weitere potenzielle Regulatoren der RNA-Polymerase I-Transkription

Neben den basalen Transkriptionsfaktoren konnten weitere Proteine als Regulatoren der RNA-Polymerase I-Transkription identifiziert werden. Aus dem Thuriaux-Labor kamen erste Hinweise, dass in *S. cerevisiae* ein HMG (high mobility group)-Box-Protein namens Hmo1p einen aktivierenden Einfluss auf die rRNA-Synthese ausübt (Gadal et al., 2002). Wie der UBF in höheren Eukaryoten bindet Hmo1p an die gesamte rDNA (Hall et al., 2006) und könnte somit ebenfalls an der Ausbildung einer rDNA-spezifischen Chromatinstruktur beteiligt sein (nach Moss, 2004). Da der Faktor außerdem mit zahlreichen RP (ribosomal protein)-Gen-Promotoren interagiert, wäre es ferner denkbar, dass Hmo1p als übergeordneter Regulator die Synthese der verschiedenen ribosomalen Komponenten koordiniert (Hall et al., 2006).

Darüber hinaus wurden mehrere Faktoren, die an der Regulation der mRNA-Synthese durch die RNA-Polymerase II beteiligt sind, mit der RNA-Polymerase I-Transkription in Verbindung gebracht. Eine gemeinsame Arbeit des Grummt- und des Tschochner-Labors lässt vermuten, dass der aus neun Untereinheiten bestehende Transkriptionsfaktor-IIH (TF-IIH), der eine essenzielle Funktion in der Nukleotid-Excisionsreparatur (NER) und der RNA-Polymerase II-Transkription ausübt, gleichzeitig die RNA-Polymerase I-Transkription stimuliert (Iben et al., 2002; Bier, 2004). Auf welche Weise der Faktor die rRNA-Synthese moduliert, ging aus der Studie nicht hervor. Allerdings scheinen im Maussystem weder die ATPase-, die Helikase- noch die Kinase-Aktivität des TF-IIH für die Regulation der Pol I-Transkription benötigt zu werden. Da in einem In-vitro-Assay die Transkription zwar initiiert wurde, aber keine Vollständigtranskripte erzeugt wurden, wenn TF-IIH fehlte, wird angenommen, dass der Faktor nicht die Initiation aktiviert, sondern an einem späteren Punkt in die Pol I-Transkription eingreift (nach Iben et al., 2002).

Des Weiteren könnte die Phosphatase Fcp1p in die Regulation der rRNA-Synthese involviert sein. Bei der Transkription der proteinkodierenden Gene sorgt Fcp1p durch Dephosphorylierung der großen Pol II-Untereinheit dafür, dass das Enzym die Transkription korrekt terminieren und reinitiiert kann. Fath und Kollegen zufolge aktiviert Fcp1p in *S. cerevisiae* darüber hinaus die RNA-Polymerase I-Transkription, wobei wiederum ein Postinitiationsschritt von der Regulation betroffen zu sein scheint (Fath et al., 2004). Erste Hinweise, dass Fcp1p eine Pol I-Untereinheit (entweder ABC23 oder AC19) teilweise dephosphoryliert, müssen noch bestätigt werden. Neben Fcp1p konnte auch der Spt4p/Spt5p-Komplex mit der Hefe-RNA-Polymerase I kopräzipitiert werden. Die beiden Proteine, die zunächst als Regulatoren der RNA-Polymerase II-Elongation charakterisiert wurden, scheinen zusätzlich die Elongation der RNA-Polymerase I zu modulieren (Schneider et al., 2006).

Ferner wurden nukleäres Aktin und Myosin als positive Transkriptionsregulatoren beschrieben. Aktin assoziiert mit allen drei eukaryotischen RNA-Polymerasen und scheint zusammen mit Myosin chromatinmodifizierende und -verändernde Proteine an die zu transkribierende DNA zu rekrutieren (Übersicht bei Grummt, 2006).

1.6 Die Ribosomenbiogenese im Überblick

Bei der Entstehung der eukaryotischen 80S-Ribosomen assemblieren über 70 ribosomale Proteine an vier rRNAs, wovon drei (18S-, 5,8S-, 28S/25S-rRNA) aus einem von der RNA-Polymerase I synthetisierten Vorläufertranskript (Prä-rRNA) hervorgehen. Der Zusammenbau der beiden ribosomalen Untereinheiten erfolgt in Eukaryoten nicht spontan, sondern wird ebenso wie die Prozessierung der Prä-rRNA von über 170 nicht ribosomalen Proteinen und RNAs katalysiert, welche im Laufe der Ribosomenreifung vorübergehend mit den Vorläuferpartikeln wechselwirken. Die auch als Prozessierungsfaktoren bezeichneten nicht ribosomalen Proteine und RNAs umfassen RNA-spaltende und -modifizierende Enzyme (Endo- und Exoribonukleasen, Methyltransferasen, Pseudouridinsynthasen), RNA-Helikasen, Chaperone, Transport- und Exportproteine sowie zahlreiche snoRNAs (small nucleolar RNAs) (nach Fromont-Racine et al., 2003; Tschochner und Hurt, 2003).

Obwohl die ersten präribosomalen Partikel bereits in den 70er Jahren entdeckt wurden, gelang es erst 30 Jahre später, deren Zusammensetzung näher zu charakterisieren. Denn dank verbesserter Affinitätsaufreinigungsprotokolle können seit kurzem große Proteinkomplexe unter physiologischen Bedingungen aufgereinigt und anschließend die präzipitierten Polypeptide massenspektrometrisch identifiziert werden. Meistens wird die Hefe *S. cerevisiae*, die sich leicht genetisch manipulieren und in großem Maßstab kultivieren lässt, für derartige Analysen verwendet. Verschiedene ribosomale Vorläuferpartikel konnten mit Hilfe der neuen Methoden isoliert und biochemisch charakterisiert werden. Darüber hinaus gelang es, die einzelnen Partikel mittels mikroskopischer Verfahren bestimmten Zellkompartimenten zuzuordnen, woraufhin ein detailliertes Modell zum räumlich-zeitlichen Ablauf der Ribosomenbiogenese entwickelt wurde (Übersicht bei Tschochner und Hurt, 2003):

In *S. cerevisiae* beginnt die Prozessierung des rRNA-Vorläufers mit der Anlagerung eines mehr als 2 MDa großen Ribonukleoproteinkomplexes an die 5'-Enden der entstehenden 35S-prä-rRNAs. Dieser als SSU-Prozessom (small subunit processome) bezeichnete Partikel, der neben der U3-snoRNA etwa 40 Utps (U three associated proteins) enthält (Dragon et al., 2002), entspricht vermutlich den „terminal knobs“, welche bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen sog. Miller-Spreads an den 5'-Enden der sich bildenden Prä-rRNAs beobachtet wurden (Miller und Beatty, 1969; Mougey et al., 1993). Zusätzlich zum SSU-Prozessom assoziieren zahlreiche ribosomale Proteine der kleinen Untereinheit (ribosomal proteins of the small subunit – rpS) sowie weitere 40S-Prozessierungsfaktoren mit der 35S-rRNA, sodass ein ribosomaler Vorläuferpartikel entsteht, der aufgrund seines Sedimentationsverhaltens als 90S-Präribosom bezeichnet wird (nach Tschochner und Hurt, 2003). Während der 90S-Bildung wird die 35S-prä-rRNA U3-snoRNA-abhängig an den Stellen A₀ und A₁ zur 32S-prä-rRNA gespalten (siehe Abb. 1.6) und kovalent modifiziert.

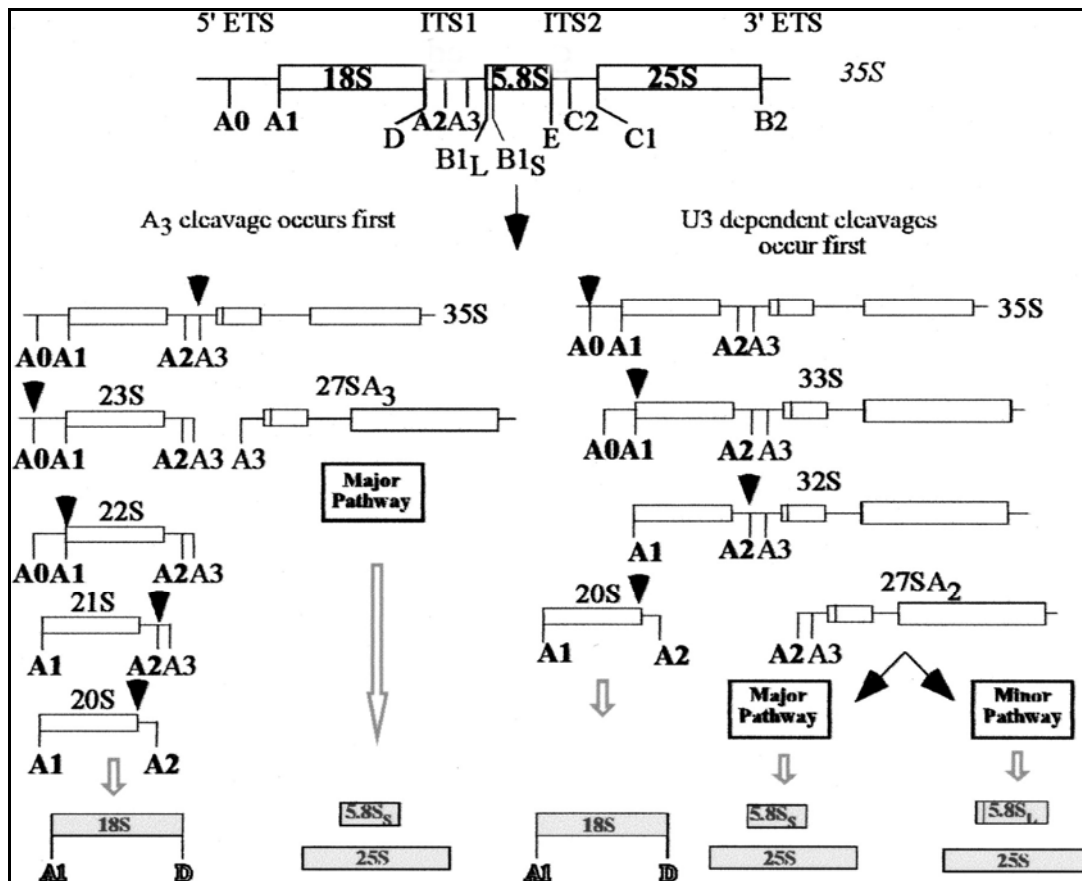


Abb. 1.6: Übersicht über die Prozessierung der 35S-prä-rRNA in *S. cerevisiae* (aus Gallagher et al., 2004).

Bei den rRNA-Modifikationen handelt es sich um 2'-Ribose-Methylierungen sowie um Pseudouridinylierungen. Es wird diskutiert, dass beide Veränderungen, welche gehäuft in den katalytisch aktiven Bereichen der reifen rRNAs auftreten, diesen eine stabilere Konformation verleihen. In *S. cerevisiae* werden die rRNA-Modifikationen von snoRNPs vermittelt. Im Falle der 2'-O-Methylierungen binden kurze konservierte Abschnitte sog. Box-C/D-snoRNAs an komplementäre rRNA-Bereiche, sodass eine 2'-O-Methyltransferase (vermutlich Nop1p) bestimmte rRNA-Nukleotide an der Interaktionsstelle modifizieren kann. Im Gegensatz dazu sind an der Umwandlung von Uridinresten zu Pseudouridinen H/ACA-snoRNAs und die Pseudouridinsynthase Cbf5p beteiligt (Übersicht bei Fromont-Racine et al., 2003).

Durch eine weitere U3-abhängige Spaltung der Prä-rRNA an der Stelle A₂ wird das 90S-Präribosom schließlich in einen 40S- und einen 60S-Vorläufer aufgeteilt. Dabei gehen aus der 32S-prä-rRNA die 20S- und die 27SA₂-prä-rRNA hervor. Der 40S-Vorläuferpartikel, welcher die 20S-prä-rRNA enthält, wird nach Dissoziation der meisten Prozessierungsfaktoren relativ schnell ins Zytoplasma exportiert. Dort findet in einem letzten Prozessierungsschritt, welcher die Spaltung der 20S- zur 18S-rRNA umfasst, die Bildung der reifen 40S-Untereinheit statt (nach Tschochner und Hurt, 2003). Neben der 18S-rRNA enthält diese 32 ribosomale Proteine (rpS).

Im Gegensatz zu den 40S-Prozessierungsfaktoren assoziieren die Prozessierungsfaktoren der großen Untereinheit nicht schon mit dem 90S-Präribosom, sondern lagern sich größtenteils erst während oder unmittelbar nach der A₂-Spaltung an den entstehenden 60S-Vorläufer an. Dieser setzt sich aus der 27SA₂-prä-rRNA, den ribosomalen Proteinen der großen Untereinheit (ribosomal proteins of the large subunit – rpL) und den 60S-Prozessierungsfaktoren zusammen. Während sich die heranreifenden großen Untereinheiten vom Nukleolus zu den Kernporen bewegen, wird die 27SA₂-rRNA über verschiedene Zwischenstufen zu den reifen 5,8S- und 25S-rRNAs prozessiert. Gleichzeitig wird die von der RNA-Polymerase III synthetisierte 5S-rRNA in die Vorläuferpartikel integriert. Parallel dazu findet eine schrittweise Dissoziation der meisten Prozessierungsfaktoren statt. Bislang konnten keine nukleoplasmatischen 40S-Vorläufer nachgewiesen werden. Im Unterschied dazu wurden einige der aufgereinigten Prä-60S-Komplexe eindeutig dem Nukleoplasma zugeordnet. Sie unterscheiden sich in ihrer Protein- und rRNA-Zusammensetzung voneinander und wurden als intermediäre und späte Prä-60S-Partikel von den frühen nukleolären 60S-Vorläufern abgegrenzt. Die späten Prä-60S-Partikel werden Crm1p/Xpo1p-abhängig ins Zytoplasma exportiert, wo die abschließende Prozessierung zur reifen 60S-Untereinheit stattfindet, die aus den drei bereits erwähnten rRNAs sowie aus 46 ribosomalen Proteinen (rpL) besteht (Zusammenfassung bei Tschochner und Hurt, 2003). Das zuvor beschriebene Modell zur Ribosomenbiogenese ist in Abb. 1.7 zusammengefasst.

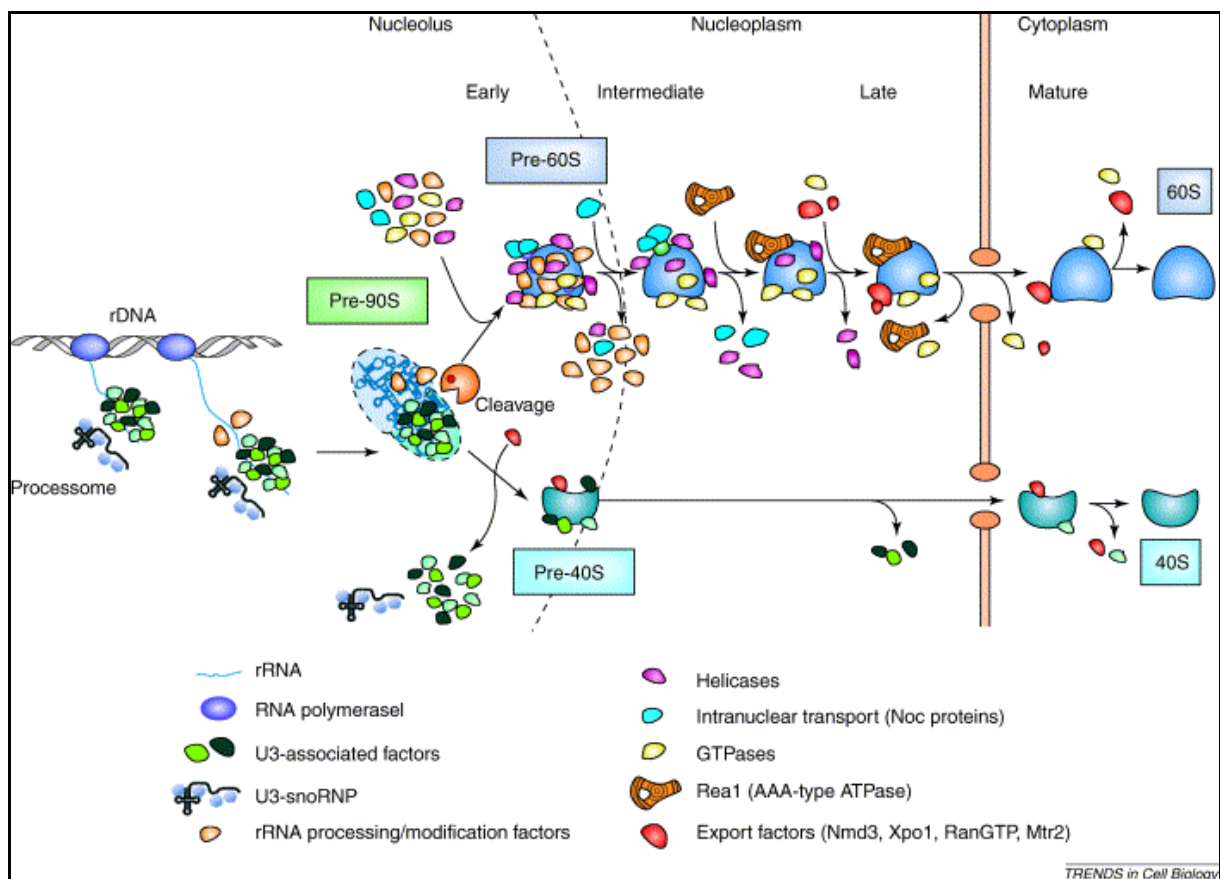


Abb. 1.7: Modell zum Ablauf der Ribosomenbiogenese in *S. cerevisiae* (aus Tschochner und Hurt, 2003).

Nach Meinung des Baserga-Labors beginnt die rRNA-Reifung nicht immer mit den U3-snoRNA-abhängigen Spaltungen an den Stellen A₀, A₁ und A₂. Die Gruppe fand Hinweise, dass die Prozessierung der Prä-rRNA ebenso durch eine U3-unabhängige Spaltung an der Stelle A₃ initiiert werden kann. Bei dieser Variante gehen aus dem Primärtranskript die 23S- und die 27SA₃-prä-rRNA hervor (vgl. Abb. 1.6). Die 23S-Zwischenstufe wird daraufhin durch Schnitte an den Stellen A₀-A₂ zur 20S-prä-rRNA prozessiert, die anschließend ebenso wie die 27SA₃-rRNA den zuvor erläuterten Hauptprozessierungsweg durchläuft (Zusammenfassung bei Gallagher et al., 2004).

1.7 Fragestellung

Ribosomensynthese findet nur in wachsenden eukaryotischen Zellen statt. Sobald ein Wachstumsarrest eintritt, werden sowohl die rRNA-Synthese als auch die Transkription der für die ribosomalen Proteine kodierenden Gene reprimiert. Indem die RNA-Polymerase I (Pol I) ein rRNA-Vorläufertranskript (Prä-rRNA) herstellt, aus dem drei der vier reifen eukaryotischen rRNAs hervorgehen, ist sie maßgeblich an der Genese neuer Ribosomen beteiligt. Um die Transkription an den Promotoren der für die Prä-rRNA kodierenden rRNA-Gene initiieren zu können, muss die Pol I einen Komplex mit dem Transkriptionsfaktor Rrn3(p) ausbilden. In vivo wird das Enzym nur in Assoziation mit diesem Protein an den Transkriptionsstartpunkt rekrutiert. Interessanterweise verfügen wachsende eukaryotische Zellen über weitaus größere Mengen des zur Initiation benötigten Pol I-Rrn3(p)-Komplexes als stationäre und wachstumsarretierte Zellen. Da neue rRNAs ebenfalls nur in wachsenden Zellen synthetisiert werden, wurde ein Modell entwickelt, nach dem die Pol I-abhängige rRNA-Synthese auf der Ebene der Transkriptionsinitiation über die Menge der Pol I-Rrn3(p)-Komplexe reguliert wird.

Zu Beginn dieser Promotion war zwar bekannt, dass stationäre und mit Rapamycin behandelte *S. cerevisiae*-Zellen deutlich geringere Komplexmengen enthalten als wachsende Hefen, der Mechanismus des Komplexverlustes konnte damals jedoch nicht erklärt werden. Ferner geht aus neueren Studien hervor, dass möglicherweise nicht nur die Pol I-Initiation, sondern auch nachfolgende Transkriptionsschritte einer wachstumsabhängigen Kontrolle unterliegen. Um besser verstehen zu können, wie sich in *S. cerevisiae* positive und negative Wachstumssignale auf die rRNA-Synthese auswirken, sollte in dieser Arbeit zunächst nach möglichen Ursachen für den in wachstumshinhibierten Hefen stattfindenden Verlust an initiationskompetenten Pol I-Rrn3p-Komplexen gesucht werden. Hierbei galt es vor allem, die Funktion des Transkriptionsfaktors Rrn3p näher zu charakterisieren. Darüber hinaus sollte analysiert werden, ob die wachstumsabhängige Regulation der rRNA-Synthese tatsächlich nur über die Pol I-Initiation vermittelt wird, und so insgesamt zu einem besseren Verständnis der Ribosomenbiogenese in *S. cerevisiae* beigetragen werden.

2 ERGEBNISSE

Eukaryotische Zellen enthalten zwei verschiedene RNA-Polymerase I (Pol I)-Populationen. Beide können in vitro unspezifisch RNA synthetisieren, doch nur eine Form ist in der Lage, die Transkription am rDNA-Promotor spezifisch zu initiieren. Diese initiationskompetente Pol I-Population zeichnet sich dadurch aus, dass sie in einem stabilen Komplex mit dem Transkriptionsfaktor Rrn3(p) vorliegt. Interessanterweise wird der Pol I-Rrn3(p)-Komplex lediglich in wachsenden eukaryotischen Zellen gefunden. Sobald Säuger- oder *S. cerevisiae*-Zellen die stationäre Phase erreichen, gehen sowohl der Komplex als auch die spezifische Initiationsaktivität verloren (Milkereit und Tschochner, 1998; Yuan et al., 2002). Darüber hinaus werden nach Serum- und Nährstoffentzug sowie in cycloheximid- und rapamycinbehandelten eukaryotischen Zellen weniger Komplexe nachgewiesen (Yuan et al., 2002; Claypool et al., 2004; Mayer et al., 2004).

In Säugern scheinen Assoziation und Dissoziation des Pol I-Rrn3-Komplexes vom Phosphorylierungszustand des Rrn3 abzuhängen. Nachdem gezeigt wurde, dass in vitro lediglich das phosphorylierte Protein die Polymerase an den rDNA-Promotor rekrutiert (Cavanaugh et al., 2002; Hirschler-Laszkiewicz et al., 2003), wurden anschließend zahlreiche Rrn3-Phosphorylierungsstellen und die an den Phosphorylierungsreaktionen beteiligten Signalmoleküle identifiziert (Zhao et al., 2003; Mayer et al., 2004; Mayer et al., 2005). Daher kann mittlerweile sehr gut erklärt werden, wie im Säugersystem positive und negative Wachstumssignale die Initiation der Pol I-Transkription modulieren. In der Hefe *S. cerevisiae* muss weniger Rrn3p als vielmehr die RNA-Polymerase I ein bestimmtes Phosphorylierungsmuster aufweisen, um einen initiationskompetenten Komplex ausbilden zu können. Rrn3p vermag hingegen auch im unphosphorylierten Zustand an das Enzym zu binden, liegt in vivo allerdings ebenso wie die Pol I als Phosphoprotein vor (Fath et al., 2001).

Wie in der Hefe die Menge der Pol I-Rrn3p-Komplexe bei einem Wachstumsarrest herunterreguliert wird, konnte bislang nicht geklärt werden. Daher sollte in der vorliegenden Doktorarbeit nach möglichen Ursachen für dieses Phänomen gesucht werden, wobei das Hauptaugenmerk auf den Transkriptionsfaktor Rrn3p gerichtet werden sollte.

2.1 Vergleich der in wachsenden und wachstumsarretierten *S. cerevisiae*-Zellen vorkommenden Rrn3p- und RNA-Polymerase I-Mengen

Western-Blots, in denen die in wachsenden und wachstumsinhibierten Hefen vorkommenden Rrn3p- und RNA-Polymerase I-Mengen miteinander verglichen wurden, lieferten einen ersten Hinweis, dass in *S. cerevisiae* proteolytische Vorgänge an der wachstumsabhängigen Regulation der RNA-Polymerase I-Transkription beteiligt sein könnten.

Bei der Durchführung des Experiments wurde im Detail wie folgt vorgegangen: Da die dem Labor zur Verfügung stehenden α -Rrn3p-Antikörper das in Gesamtzellextrakten vorkommende Rrn3p nur sehr schlecht erkennen, wurden Wildtyp (WT)-Hefestämme verwendet, die den Faktor als TAP (tandem affinity purification)- bzw. HA (Hämagglutinin)-Fusionsprotein exprimieren. In Western-Blots können diese Fusionsproteine mit Hilfe von PAP (Peroxidase-anti-Peroxidase)-Immunkomplexen und α -HA-Antikörpern nachgewiesen werden. Nachdem YPD-Kulturen der beiden Leucin-auxotrophen Stämme (BSY420-Rrn3-TAP und YPH499-Rrn3-HA₃) die logarithmische Wachstumsphase erreicht hatten, wurden die Zellen in das synthetische Mangelmedium SDC-Leu überführt. Des Weiteren wurden wachsende Kulturen der beiden Stämme mit 200 ng/ml Rapamycin behandelt, das die für das Wachstum essenziellen Tor (target of rapamycin)-Kinasen inhibiert. In einem dritten Ansatz wurden die YPD-Kulturen mit 100 μ g/ml Cycloheximid, einem Hemmstoff der Proteinsynthese, versetzt, was ebenso wie Aminosäuredepletion und Rapamycinbehandlung einen Wachstumsarrest induziert. Unmittelbar vor (Zeitpunkt: 0 min) sowie 30, 60 und 120 Minuten nach Beginn der jeweiligen Behandlung wurden die Hefen geerntet und in einem Hochsalzpuffer aufgeschlossen. Anschließend wurden gleiche Mengen Gesamtzellextrakt in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und einer Western-Blot-Analyse unterzogen.

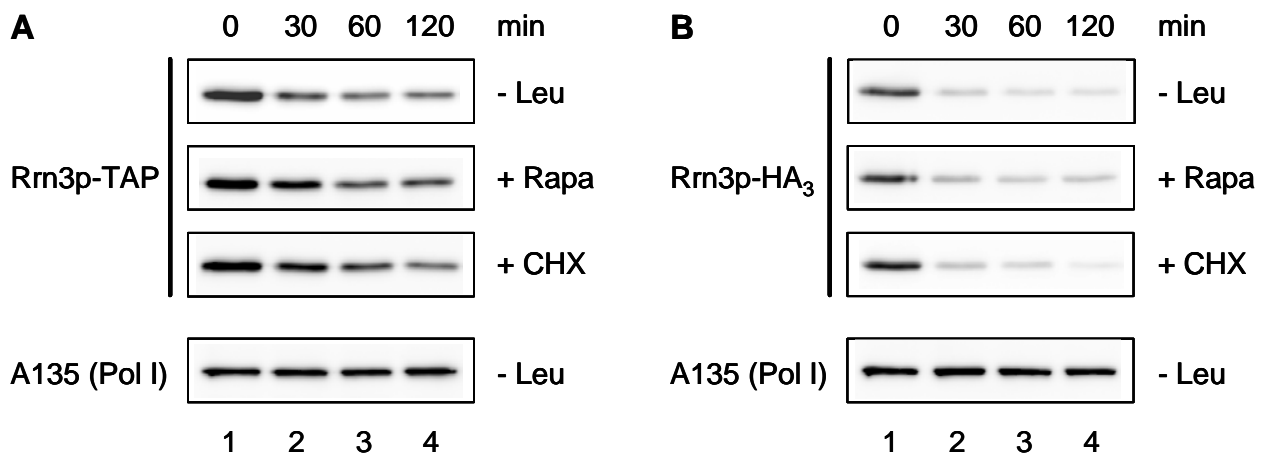


Abb. 2.1: Vergleich der in wachsenden und wachstumshinhibierten *S. cerevisiae*-Zellen vorkommenden Rrn3p- und RNA-Polymerase I-Mengen.

In YPD-Medium wachsende Zellen der *S. cerevisiae*-Stämme BSY420-Rrn3-TAP (**A**) und YPH499-Rrn3-HA₃ (**B**) wurden in SDC-Leu-Medium überführt (- Leu), mit 200 ng/ml Rapamycin behandelt (+ Rapa) sowie mit 100 μ g/ml Cycloheximid versetzt (+ CHX). Unmittelbar vor (0 min) sowie 30, 60 und 120 min nach Beginn der jeweiligen Behandlung wurden die Zellen geerntet. Jeweils gleiche Mengen (30 μ g) der mittels Hochsalzaufschluss hergestellten Gesamtzellextrakte wurden in 8 %igen Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membranen übertragen. Bei der anschließend durchgeführten Western-Blot-Analyse wurden für den Rrn3p-Nachweis PAP-Immunkomplexe (**A**) und der monoklonale α -HA-Antikörper 12CA5 (**B**) verwendet, während die RNA-Polymerase I mit Hilfe eines polyklonalen α -A135-Kaninchen-Antikörpers detektiert wurde. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden in beiden Teilabbildungen lediglich die in den aminosäuredepletierten Hefen vorkommenden A135-Mengen gezeigt.

Die mit dem Stamm BSY420-Rrn3-TAP durchgeführten Experimente sind in Abb. 2.1 A dokumentiert. Man erkennt, dass die wachstumsarretierten Hefen (Spuren 2-4) deutlich weniger TAP-getagtes Rrn3p enthielten als die wachsenden Zellen (Spur 1). Der Effekt ist sowohl nach Aminosäureentzug als auch nach Rapamycin- und Cycloheximidzugabe zu erkennen und trat bereits 30 Minuten nach Beginn der jeweiligen Behandlung auf. Im Gegensatz zur Rrn3p-Menge wurde die Menge der Pol I-Untereinheit A135 nicht reduziert. Mit dem Stamm YPH499-Rrn3-HA₃ konnten übereinstimmende Beobachtungen gemacht werden, wobei allerdings das HA₃-getagte Rrn3p schneller und stärker herunterreguliert wurde als das TAP-Fusionsprotein. Die Menge der Pol I-Untereinheit A135 blieb wiederum unverändert (siehe Abb. 2.1 B). In stationären Hefen konnte der Rrn3p-Verlust ebenfalls beobachtet werden; im Gegensatz zu den wachstumsarretierten Zellen wiesen diese allerdings auch deutlich reduzierte Pol I-Mengen auf (vgl. Abb. 2.4 A).

2.2 Untersuchung der Rrn3p-Stabilität in Hefemutanten mit eingeschränkter Proteasom- bzw. Vakuolenfunktion

Nachdem in wachstumsarretierten WT-Hefen eine Abnahme der Rrn3p-Menge beobachtet worden war, wurde zunächst nach der molekularen Grundlage für den Proteinverlust gesucht. Eine genomweite, in der *Saccharomyces* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org>) dokumentierte Microarray-Studie kam zu dem Ergebnis, dass die mRNAs zahlreicher Ribosomenbiogenese-Faktoren bei Aminosäuremangel herunterreguliert werden. Zu den betroffenen Transkripten zählen u.a. die mRNAs von mehreren Pol I-Untereinheiten sowie die Rrn3p-mRNA. Auf Proteinebene verringert sich hingegen lediglich die Rrn3p-Menge, was auf einen gezielten, bei ungünstigen Wachstumsbedingungen stattfindenden Rrn3p-Proteinabbau hindeutet.

In *S. cerevisiae* werden Proteine auf zwei unterschiedliche Arten abgebaut. Während Faktoren, die kurzfristig aus einer Reaktion entfernt werden müssen, in der Regel vom 26S-Proteasom degradiert werden, kommt es bei langfristigen Prozessen häufig zur Aufnahme größerer Proteinmengen oder sogar ganzer Organellen in die Vakuole, welche die inkorporierten Zellbestandteile ebenfalls zersetzt (Übersicht in Ciechanover, 2004). Die Rrn3p-Menge nimmt bereits innerhalb der ersten 30 Minuten nach Auslösung eines Wachstumsstopps deutlich ab, was auf proteasomabhängige Degradation hindeutet. Um diese Vermutung überprüfen zu können, wurde auf einen Hefestamm zurückgegriffen, der eine ts (temperatursensitive)-Mutation in dem Gen CIM3 aufweist (Hiller et al., 1996). Die von diesem Gen kodierte ATPase Cim3p ist ein essenzieller Bestandteil der regulatorischen 19S-Untereinheit des Proteasoms. Da die Mutation nicht letal ist, kann der Hefestamm bei niedrigen (permissiven) Temperaturen überleben. Erhöht man jedoch die Temperatur auf 37 °C (restriktive Temperatur), vermag die ATPase ihre Funktion nicht mehr auszuüben, was zu einer Inaktivierung des Proteasoms führt. In der Folge werden all diejenigen Proteine, die normalerweise proteasomabhängig degradiert werden, nicht mehr abgebaut. Mit Hilfe

dieses sog. Proteasom-ts-Stammes (cim3-1) sollte es demnach möglich sein, eine eventuelle Beteiligung des Proteasoms am Rrn3p-Verlust in wachstumsinhibierten Zellen nachzuweisen.

Um das Experiment durchführen zu können, wurde zunächst in dem ts- und einem isogenen WT-Stamm ein TAP-Tag an das endogene RRN3-Gen fusioniert (zur Herstellung der Stämme siehe Kap. 4.5.14.1). Die daraus resultierenden Stämme cim3-1-Rrn3-TAP (ts) und YWO365-Rrn3-TAP (WT) wurden bei einer Temperatur von 24 °C in YPD-Medium kultiviert. Nach Erreichen der logarithmischen Phase wurden die Zellen in vorgewärmtes SDC-Leu-Medium transferiert und anschließend bei 37 °C weiterkultiviert. Auf diese Weise wurden gleichzeitig sowohl das Zellwachstum als auch die Proteasomaktivität inhibiert. Unmittelbar vor sowie 30, 60 und 120 Minuten nach Beginn der Behandlung wurden die Zellen geerntet. Die aus den verschiedenen Proben mittels Hochsalzaufschluss gewonnenen Gesamtzellextrakte wurden in dem in Abb. 2.2 dargestellten Western-Blot analysiert.

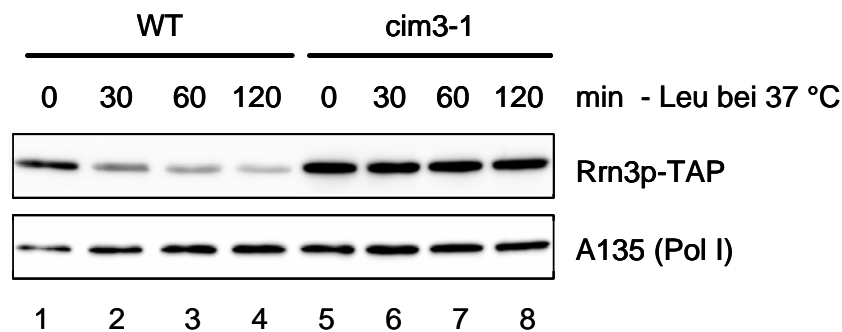


Abb. 2.2: Analyse der Rrn3p-Menge in der Proteasom-ts-Mutante cim3-1 bei gleichzeitiger Inhibition des Zellwachstums und der Proteasomaktivität.

Bei 24 °C wachsende Zellen der Proteasom-ts-Mutante cim3-1-Rrn3-TAP und des isogenen WT-Stammes YWO365-Rrn3-TAP wurden von YPD- in SDC-Leu-Medium überführt und gleichzeitig auf eine Temperatur von 37 °C gebracht. Aus den unmittelbar vor (0 min) sowie 30, 60 und 120 min nach Behandlungsbeginn geernteten Hefen wurden Gesamtzellextrakte hergestellt, wovon jeweils 30 µg in einem 8 %igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt wurden. In dem anschließend durchgeführten Western-Blot kamen PAP-Immunkomplexe zum Nachweis des TAP-getagten Rrn3p sowie ein polyklonaler α-A135-Kaninchen-Antikörper zum Einsatz.

Während das im WT-Stamm exprimierte Rrn3p infolge der Wachstumsinhibition herunterreguliert wurde (Spuren 1-4), blieb die Proteinmenge in der inaktivierten Proteasom-ts-Mutanten trotz Aminosäuredepletion unverändert (Spuren 5-8). Folglich ist das 26S-Proteasom für den in wachstumsinhibierten Hefen stattfindenden Rrn3p-Verlust verantwortlich.

Obwohl der oben beschriebene Versuch ein eindeutiges Ergebnis geliefert hatte, konnte eine Beteiligung der Vakuole am Rrn3p-Abbau nicht ausgeschlossen werden. Deshalb wurde im Stamm BSY420-Rrn3-TAP das Gen PEP4 deletiert (vgl. Kap. 4.5.14.4), welches für die nicht essenzielle vakuoläre Proteinase yscA kodiert. Bei Disruption des genannten Gens fallen neben yscA noch zwei weitere vakuoläre Proteasen (yscB und yscY) aus, die normalerweise yscA-abhängig aktiviert

werden. Infolgedessen ist in Δ pep4-Hefen die in der Vakuole stattfindende Proteolyse stark eingeschränkt (Teichert et al., 1989). Das Resultat der mit der Mutante und dem isogenen WT-Stamm durchgeführten Aminosäuredepletion ist in Abb. 2.3 dargestellt.

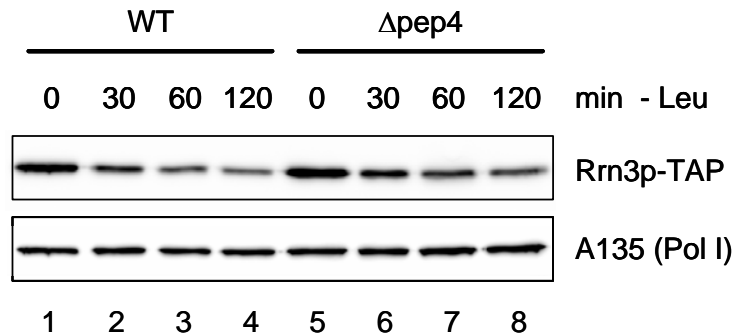


Abb. 2.3: Untersuchung der Rrn3p-Stabilität in einer Hefemutante mit eingeschränkter Vakuolenfunktion. Von YPD- in SDC-Leu-Medium überführte Zellen der Hefestämme BSY420-Rrn3-TAP (WT) und BSY420-Rrn3-TAP- Δ pep4 wurden unmittelbar vor (0 min) sowie 30, 60 und 120 min nach Austausch des Mediums geerntet und unter Hochsalzbedingungen aufgeschlossen. Nach Auftrennung gleicher Mengen WCE (30 μ g) in einem 8 %igen SDS-Polyacrylamidgel wurde ein Western-Blot mit PAP-Immunkomplexen und einem α -A135-Antikörper durchgeführt.

Man erkennt, dass das Rrn3p-TAP-Fusionsprotein in den wachstumsarretierten Δ pep4-Hefen trotz beeinträchtigter Vakuolenfunktion ähnlich schnell abgebaut wurde wie im Wildtyp. Demnach scheint die Vakuole nicht am Rrn3p-Abbau beteiligt zu sein. Vielmehr deuten die in diesem Kapitel gezeigten Ergebnisse darauf hin, dass der in wachstumsinhibierten Hefezellen beobachtete rasche Rrn3p-Verlust auf proteasomabhängige Degradation zurückzuführen ist.

2.3 Auswirkungen unterschiedlicher Rrn3p-Mengen auf das Hefewachstum und die rRNA-Syntheserate

Nach dem gegenwärtigen Modell zur wachstumsabhängigen Regulation der RNA-Polymerase I-Transkription wird die rRNA-Synthese in stationären Hefezellen eingestellt, weil sich keine initiationskompetenten Pol I-Rrn3p-Komplexe mehr ausbilden (Milkereit und Tschochner, 1998). In rapamycinbehandelten Zellen werden die rRNA-Neusynthese und die Komplexmenge ebenfalls herunterreguliert, jedoch gehen die Pol I-Rrn3p-Komplexe nicht vollständig verloren (Powers und Walter, 1999; Claypool et al., 2004). Wie im vorigen Kapitel gezeigt werden konnte, wird ein Großteil des in wachsenden Hefen exprimierten Rrn3p nach Auslösung eines Wachstumsarrests proteasomabhängig degradiert. Da der Faktor bei der Initiation der RNA-Polymerase I-Transkription eine entscheidende Funktion ausübt, lag die Vermutung nahe, dass zwischen dem beobachteten Rrn3p-Abbau und der in wachstumsinhibierten Hefen stattfindenden Inaktivierung der rRNA-Synthese ein kausaler Zusammenhang bestehen könnte. Um den Einfluss des Rrn3p auf das Hefewachstum und die rRNA-Synthese bestimmen zu können, sollte daher in wachsenden Hefen

die Rrn3p-Proteinmenge auf ein Niveau herunterreguliert werden, das demjenigen von wachstums-arretierten Zellen entspricht.

2.3.1 Der Tetracyclin-regulierbare TetO-Promotor

In *S. cerevisiae* lässt sich die Expression eines bestimmten Gens präzise induzieren oder reprimieren, wenn dieses unter die Kontrolle des galaktoseabhängigen GAL1-, des Methionin-regulierbaren MET3-, des phosphatabhängigen PHO5- oder des Kupfer-induzierbaren CUP1-Promotors gestellt wird (Übersicht in Arino und Herrero, 2003). Ein Nachteil dieser Systeme besteht darin, dass bei ihrer Verwendung das Kulturmedium verändert werden muss, was unkalkulierbare Auswirkungen auf Wachstum und Proliferation haben kann. Daher wird in letzter Zeit immer häufiger auf den Tetracyclin (Tet)-regulierbaren TetO-Promotor zurückgegriffen, um Hefegene kontrolliert an- oder abzuschalten. Das sog. Tet-System, das ursprünglich für Säugerzellen entwickelt wurde (Gossen und Bujard, 1992), basiert auf einem Tetracyclin-responsiven Transaktivator (tTA), welcher sich aus der DNA-Bindedomäne des Tetracyclin-induzierbaren Tet-Repressors (TetR) aus *E. coli* und der VP16-Aktivierungsdomäne des *Herpes simplex*-Virus zusammensetzt. In Abwesenheit von Tetracyclin bindet tTA an die ebenfalls aus *E. coli* stammenden TetO-Operator-Sequenzen des TetO-Promotors und aktiviert die Transkription des nachgeschalteten Gens. Gibt man jedoch Tetracyclin oder ein Derivat, wie beispielsweise Doxycyclin (Dox) zu den Zellen, komplexiert das Antibiotikum den Transaktivator, sodass dieser nicht mehr mit dem TetO-Promotor interagieren kann. Aufgrund der hieraus resultierenden Repression der Genexpression wird diese Variante des Tet-Systems als Tet-Off-System bezeichnet. Im Unterschied dazu beruht das Tet-On-System auf einer mutierten tTA-Version (rtTA), die nur in Anwesenheit von Doxycyclin an die TetO-Operatoren bindet. Da in beiden Systemen die Inaktivierung bzw. Aktivierung der Transkription von der verwendeten Tet- bzw. Dox-Menge abhängt, lässt sich die Expression des zu untersuchenden Gens durch Variation der Tet/Dox-Konzentration über einen weiten Bereich auf- bzw. runterregulieren. Im Gegensatz zu den anderen Expressionssystemen erfordert das Tet-System keinen Mediumswechsel; die Tet/Dox-Behandlung kann in Vollmedium erfolgen und übt nachweislich keinen störenden Einfluss auf den Stoffwechsel und das Wachstum der Hefen aus (Übersicht in Arino und Herrero, 2003).

2.3.2 Der yTHC-Stamm pTet-Rrn3-HA₃

In *S. cerevisiae* wird zur Charakterisierung essenzieller Proteine vor allem mit dem Tet-Off-System gearbeitet, wobei dieses auf zwei verschiedene Arten genutzt werden kann. Entweder werden hefespezifische Expressionsvektoren verwendet, die das tTA-Gen und den TetO-Promotor beinhalten, oder die beiden Elemente werden mittels homologer Rekombination direkt ins Hefegenom integriert. Von der zweiten Möglichkeit machten Hughes und Mitarbeiter Gebrauch, die im Rahmen einer systematischen Studie die endogenen Promotoren zahlreicher essenzieller

Hefegene durch eine TetO₇-Promotor-Kassette ersetzt (Hughes et al., 2000; Mnaimneh et al., 2004). Diese besteht aus einem Kanamycinresistenzgen sowie sieben hintereinander geschalteten TetO-Operator-Einheiten gefolgt von einem minimalen Hefepromotor. Das unter der Kontrolle eines CMV-Promotors stehende Transaktivatorgen wurde in den URA3-Lokus integriert. Auf diese Weise entstanden fast 800 Hefestämme, welche als yTHC-Stämme (yeast Tet-promoters Hughes collection strains) von Open Biosystems vertrieben werden. Der entsprechende Stamm, in dem der RRN3-Promotor ausgetauscht wurde, trägt die systematische Bezeichnung YSC1180-TH_2302. Mit Hilfe dieses Stammes (hier pTet-Rrn3 genannt) sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, wie sich eine Reduktion der intrazellulären Rrn3p-Menge auf das Hefewachstum und die rRNA-Synthese auswirkt.

Um Western-Blots durchführen zu können, wurde der Stamm pTet-Rrn3-HA₃ hergestellt, der ein dreifach HA-getagtes Rrn3p exprimiert. Der Euroscarf-Stamm BY4741, von Hughes und Kollegen als Ausgangsstamm verwendet, wurde zu Vergleichszwecken ebenfalls getagt (vgl. Kap. 4.5.14.1). In einem ersten Experiment sollte dann das Rrn3p-Expressionsniveau des pTet-Stammes mit der Wildtyp-Proteinmenge verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden Gesamtzellextrakte wachsender, aminosäuredepletierter und stationärer WT-Zellen sowie wachsender pTet-Hefen in einem Western-Blot analysiert.

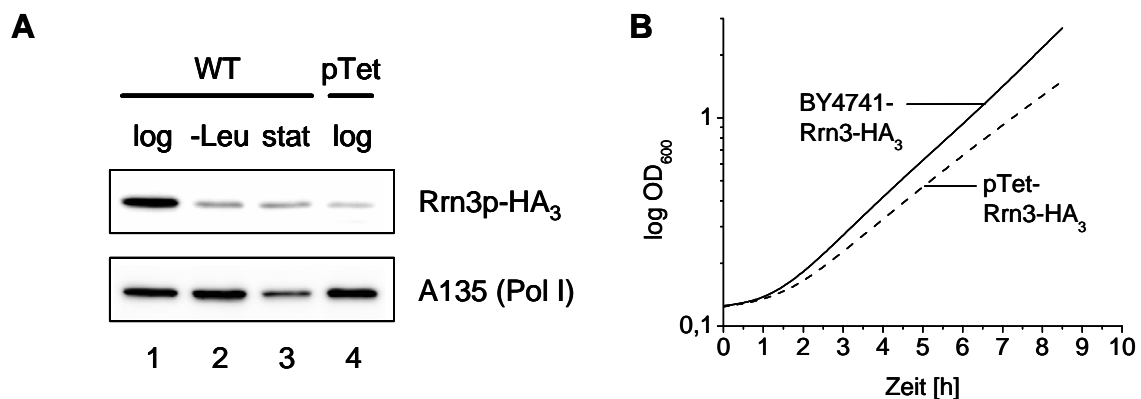


Abb. 2.4: Charakterisierung des yTHC-Stammes pTet-Rrn3-HA₃.

(A) Aus wachsenden (log), aminosäuredepletierten (2 h SDC-Leu) und stationären (stat) Zellen des WT-Stammes BY4741-Rrn3-HA₃ sowie aus wachsenden pTet-Rrn3-HA₃-Zellen wurden mittels Hochsalzaufschluss Gesamtzellextrakte hergestellt. Anschließend wurden jeweils 30 µg Gesamtprotein in einem Western-Blot analysiert, wobei das HA₃-getagte Rrn3p mit einem monoklonalen α-HA-Antikörper (16B12) detektiert wurde, während der Pol I-Nachweis mit einem gegen die A135-Untereinheit gerichteten polyklonalen Kaninchen-Antikörper erfolgte.

(B) Wachstumskinetiken der Stämme BY4741-Rrn3-HA₃ und pTet-Rrn3-HA₃ in YPD-Medium. Die beiden Kulturen (Start-OD₆₀₀ ≈ 0,1) wurden aus üN-Vorkulturen angeimpft.

Dabei stellte sich heraus, dass der TetO-Promotor-Stamm das Rrn3p-HA₃-Fusionsprotein nur sehr schwach exprimiert. Wie in Abb. 2.4 A zu erkennen ist, enthielten die wachsenden pTet-Zellen (Spur 4) eine deutlich geringere Menge des Faktors als die wachsenden Wildtyp-Hefen (Spur 1). Interessanterweise wiesen auch die aminosäuredepletierten (Spur 2) und stationären (Spur 3) WT-Kulturen größere Rrn3p-Mengen auf als der Tet-regulierbare Stamm. Während wachstums-

inhibierte und stationäre WT-Hefen jedoch aufhören zu wachsen, zeigte der TetO-Promotor-Stamm ein normales Wachstumsverhalten (Abb. 2.4 B). Folglich wird ein Wachstumsarrest nicht allein durch stark reduzierte Rrn3p-Mengen ausgelöst. Die Rrn3p-Menge könnte allerdings limitierend auf das Hefewachstum wirken, denn wie den Wachstumskinetiken zu entnehmen ist, teilte sich der pTet-Stamm langsamer als der WT-Stamm.

Das extrem niedrige Rrn3p-Expressionsniveau im pTet-Stamm deutete auf eine mögliche Fehlintegration der TetO-Promotor-Kassette hin, weswegen die DNA im Bereich des RRN3-Promotors sequenziert wurde. Dabei stellte sich heraus, dass die TetO-Promotor-Kassette nicht unmittelbar vor dem Start-ATG, sondern ca. 250 bp 5'-wärts davon integriert wurde. Der endogene RRN3-Promotor wurde somit nur teilweise bzw. gar nicht inaktiviert, weswegen die zuvor präsentierten Daten und Schlussfolgerungen angezweifelt werden mussten und auf eine Analyse der rRNA-Syntheserate verzichtet wurde.

2.3.3 Charakterisierung des TetO-Promotor-Stammes pTet₇-Rrn3-Prot.A

Um dennoch den Einfluss der Rrn3p-Menge auf das Wachstumsverhalten der Hefe und die rRNA-Synthese studieren zu können, wurde auf die von Herrero und Mitarbeitern konstruierten Tetracyclin-regulierbaren pCM-Expressionsvektoren zurückgegriffen (Gari et al., 1997). Diese verfügen entweder über eine TetO₂- oder eine TetO₇-Promotor-Kassette (in Abb. 2.5 schematisch dargestellt), sodass das zu untersuchende Gen unterschiedlich stark exprimiert werden kann.

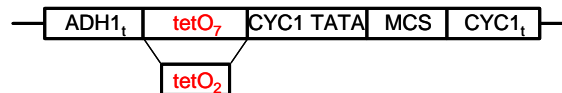


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der in den Tetracyclin-regulierbaren Expressionsvektoren pCM185 und pCM182 vorkommenden TetO₇- bzw. TetO₂-Promotor-Kassette (nach Gari et al., 1997).

ADH1_t: ADH1-Terminatorregion, tetO₇ bzw. tetO₂: TetO-Promotor aus 7 bzw. 2 tandemartig angeordneten TetO-Operator-Einheiten, CYC1 TATA: TATA-Box des CYC1-Promotors, MCS: multiple cloning site, CYC1_t: CYC1-Terminatorregion.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide pCM182 (mit 2-fachem TetO-Promotor) und pCM185 (mit 7-fachem TetO-Promotor) beinhalten außerdem das unter der Kontrolle des CMV-Promotors stehende tTA-Gen. Nach Integration einer TEV-Prot.A-HIS₇-getagten RRN3-Sequenz (kurz: Rrn3-Prot.A) in die jeweilige Klonierungsstelle (zur Klonierungsstrategie siehe Kap. 4.7.11.1) wurden die resultierenden Konstrukte in einen Hefestamm mit disruptiertem endogenem RRN3-Lokus eingeschleust (siehe Kap. 4.5.14.2), sodass die RRN3-Transkription ausschließlich durch den jeweiligen TetO-Promotor kontrolliert wurde. In dem Western-Blot in Abb. 2.6 A wurde das Rrn3p-Expressionsniveau in den Stämmen pTet₂-Rrn3-Prot.A und pTet₇-Rrn3-Prot.A mit der in einem WT-Stamm (BSY420-Rrn3-Prot.A) vorkommenden Rrn3p-Prot.A-Menge verglichen.

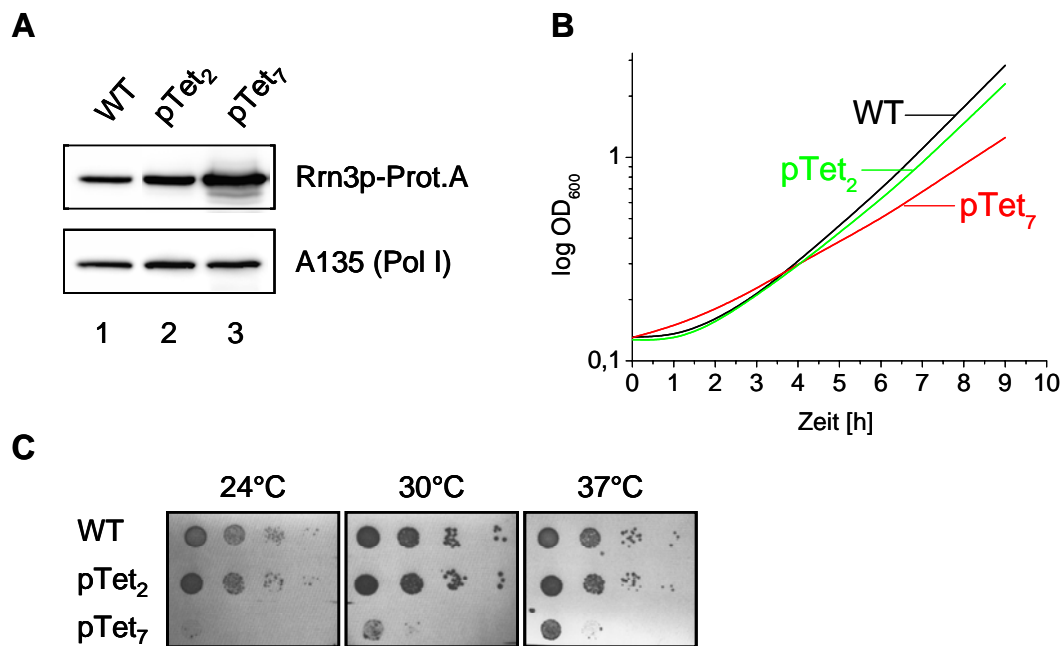


Abb. 2.6: Charakterisierung der TetO-Promotor-Stämme pTet₂-Rrn3-Prot.A und pTet₇-Rrn3-Prot.A. (A) Nachdem aus wachsenden Zellen der Hefestämme BSY420-Rrn3-Prot.A (WT), pTet₂-Rrn3-Prot.A und pTet₇-Rrn3-Prot.A Gesamtzellextrakte hergestellt worden waren, wurden jeweils 30 µg Gesamtprotein in einem Western-Blot analysiert. Für den Immunnachweis wurden PAP-Immunkomplexe und ein α-A135-Antikörper verwendet. (B) Wachstumskurven der Stämme BSY420-Rrn3-Prot.A (WT), pTet₂-Rrn3-Prot.A und pTet₇-Rrn3-Prot.A in YPD-Medium. Zum Animpfen wurden üN-Vorkulturen verwendet. (C) Tüpfeltest mit den Stämmen BSY420-Rrn3-Prot.A (WT), pTet₂-Rrn3-Prot.A und pTet₇-Rrn3-Prot.A. Die YPD-Platten wurden 48 h bei den angegebenen Temperaturen inkubiert.

Während der pTet₂-Stamm (Spur 2) nur geringfügig mehr Fusionsprotein herstellte als die WT-Hefen (Spur 1), exprimierte der pTet₇-Stamm (Spur 3) deutlich mehr Rrn3p-Prot.A. Interessanterweise wuchs der Stamm mit dem 7-fachen TetO-Promotor langsamer als die beiden anderen Stämme, wie die Kinetiken in Abb. 2.6 B erkennen lassen. Der Wachstumsdefekt zeigte sich auch, als die Hefen auf Agarplatten getüpfelt wurden, wobei die jeweilige Inkubationstemperatur (24, 30, 37 °C) keinen speziellen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der TetO-Promotor-Stämme ausübte (Abb. 2.6 C). Demnach scheinen stark erhöhte Rrn3p-Mengen das Hefewachstum einzuschränken.

Um untersuchen zu können, ob extrem niedrige Rrn3p-Mengen ebenfalls wachstumslimitierend wirken, wurden die beiden pTet-Stämme auf ihre Tetracyclin-Empfindlichkeit hin getestet. Dazu wurden die Zellen 48 Stunden lang auf YPD-Platten inkubiert, welche unterschiedliche Mengen des Tet-Derivats Doxycyclin (Dox) enthielten. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abb. 2.7 A dokumentiert.

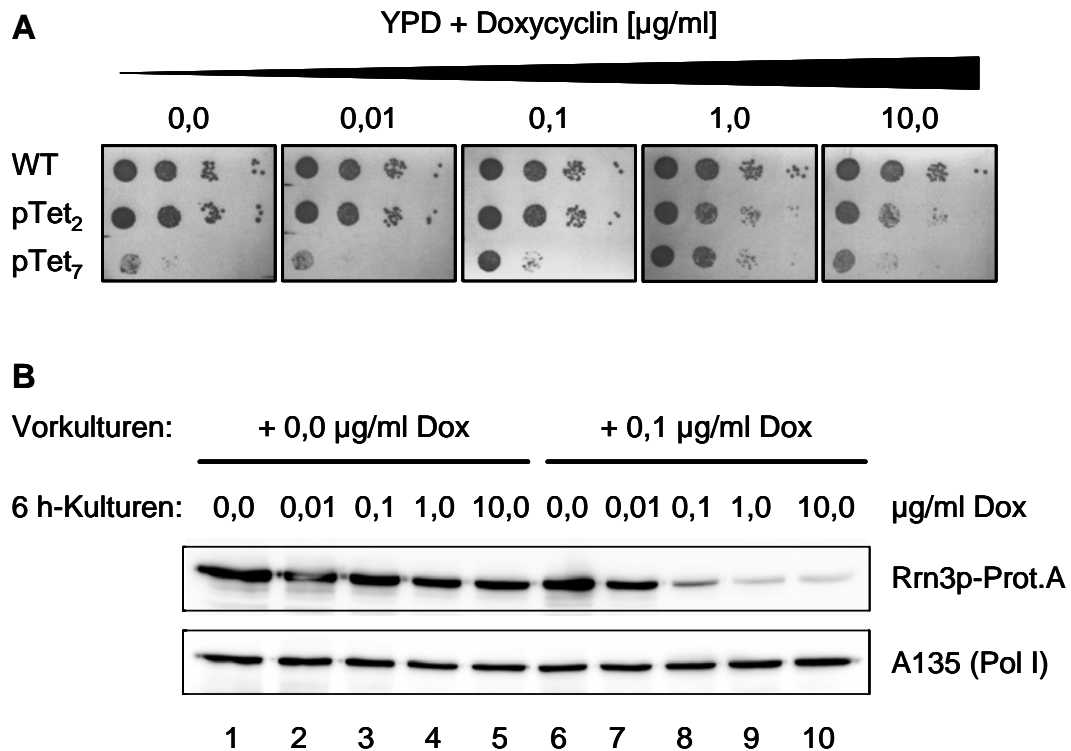


Abb. 2.7: Reaktion der TetO-Promotor-Stämme pTet₂-Rrn3-Prot.A und pTet₇-Rrn3-Prot.A auf das Tetracyclin-Analogon Doxycyclin.

(A) Tüpfeltest mit den Stämmen BSY420-Rrn3-Prot.A (WT), pTet₂-Rrn3-Prot.A und pTet₇-Rrn3-Prot.A. Die Zellen wurden 48 h auf YPD-Platten inkubiert, welche unterschiedliche Mengen des Tetracyclin-Derivats Doxycyclin enthielten.

(B) Nach einer 16-stündigen Inkubation wurden zwei früh-logarithmische 100 ml-Kulturen (Vorkulturen) des Stammes pTet₇-Rrn3-Prot.A, wovon eine bereits 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Dox enthielt, in 20 ml-Kulturen aufgeteilt. Diese wurden mit den angegebenen Dox-Mengen versetzt und 6 h weiterkultiviert, bevor die Zellen geerntet und unter Hochsalzbedingungen aufgeschlossen wurden. Anschließend wurden gleiche Mengen WCE (30 μg) in einem 8 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Dabei wurden PAP-Immunkomplexe zum Rrn3p-Prot.A-Nachweis sowie ein Pol I-spezifischer α -A135-Antikörper verwendet.

Während der pTet₂-Stamm erst bei sehr hohen Dox-Konzentrationen [10 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$ (nicht gezeigt)] einen schwachen Wachstumsdefekt erkennen ließ, zeigte der Stamm mit dem 7-fachen TetO-Promotor bei einer Dox-Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ ein deutlich besseres Wachstum als bei niedrigeren und höheren Konzentrationen. Diese eindeutige Reaktion des pTet₇-Stammes ließ den Schluss zu, dass nicht nur stark erhöhte Rrn3p-Mengen (bei niedrigen Dox-Konzentrationen) zu einer Beeinträchtigung des Hefewachstums führen, sondern dass wahrscheinlich auch geringe Proteinmengen (bei hohen Dox-Konzentrationen) wachstums-limitierend wirken.

Mit Hilfe eines Western-Blots sollte daraufhin nachgewiesen werden, dass die Rrn3p-Expression im pTet₇-Stamm auch tatsächlich auf unterschiedliche Niveaus eingestellt werden kann. Der Stamm mit dem 2-fachen TetO-Promotor wurde von nun an nicht mehr berücksichtigt. Abb. 2.7 B zeigt das Rrn3p-Expressionsniveau in pTet₇-Kulturen, die für die Dauer von 6 Stunden mit unterschiedlichen

Mengen Doxycyclin behandelt worden waren. Überraschenderweise wurde der Faktor in keiner der Kulturen herunterreguliert (Spuren 1-5). Eine Abnahme der Rrn3p-Menge konnte erst beobachtet werden, als zum Animpfen der verschiedenen Kulturen Zellen verwendet wurden, die bereits 16 Stunden lang mit 0,1 µg/ml Doxycyclin inkubiert worden waren (Spuren 6-10). In diesen „vorbehandelten“ Hefen ließ sich die Rrn3p-Expression in Abhängigkeit von der verwendeten Dox-Menge noch weiter herunterregulieren (Spuren 9 und 10) und ebenso wieder verstärken (Spuren 6 und 7).

Folglich kann die Rrn3p-Proteinmenge im pTet₇-Stamm mit der geeigneten Dox-Konzentration auf ein sehr niedriges Niveau gesenkt werden. Der Effekt scheint sich aber erst nach einer gewissen Zeit bemerkbar zu machen, weswegen die Dox-Behandlung von nun an bereits 16-18 Stunden vor Versuchsbeginn erfolgte.

2.3.4 Einfluss unterschiedlicher zellulärer Rrn3p-Mengen auf das Hefewachstum und die rRNA-Syntheserate

Die im vorigen Abschnitt gezeigten Daten belegen, dass das Rrn3p-Expressionsniveau in dem Tetracyclin-regulierbaren Stamm pTet₇-Rrn3-Prot.A über einen weiten Bereich variiert werden kann. Folglich sollte mit Hilfe dieses Stammes geklärt werden können, ob Rrn3p-Mengen, die dem Niveau von wachstumsarretierten Hefen entsprechen, zu einer Herunterregulierung der rRNA-Synthese und zu einer Inhibition des Hefewachstums führen. Daneben bestand die Möglichkeit, den Einfluss stark erhöhter Rrn3p-Mengen auf Wachstum und Pol I-Transkription zu untersuchen.

Während das Wachstumsverhalten des TetO-Promotor-Stammes anhand von Wachstumskurven charakterisiert wurde, wurde die in den Zellen stattfindende rRNA-Synthese mit Hilfe von In-vivo-Pulse-Labelings analysiert. Basierend auf Vorversuchen zur Bestimmung der erforderlichen Doxycyclin-Konzentrationen (Ergebnisse nicht gezeigt) wurden früh-logarithmische pTet₇-Hefen mit 0,1, 0,5 und 1,0 µg/ml Dox versetzt bzw. unbehandelt weiterkultiviert. Nach einer 17-stündigen Inkubation wurden die pTet₇- sowie eine wachsende und eine rapamycinbehandelte BSY420-Rrn3-Prot.A-Kultur (WT) aufgeteilt. Während jeweils ein Aliquot unter Hochsalzbedingungen aufgeschlossen und einer Western-Blot-Analyse unterzogen wurde, wurde der andere Teil der Kulturen zur Untersuchung der rRNA-Neusynthese 15 Minuten mit ³H-gelabeltem Uracil gepulst. Die im Anschluss aus den Zellen extrahierte Gesamt-RNA wurde in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert, sodass die während des Pulses neusynthetisierte, ³H-markierte rRNA mit Hilfe eines Phosphorimagers sichtbar gemacht werden konnte. Um die in den einzelnen Gelspuren aufgetragene Gesamt-rRNA-Menge bestimmen zu können, wurde die Membran anschließend mit einer gegen die 25S-rRNA gerichteten ³²P-markierten Oligosonde hybridisiert. In einem davon unabhängigen Experiment wurden außerdem die Wachstumskurven der verschiedenen pTet₇-Kulturen ermittelt.

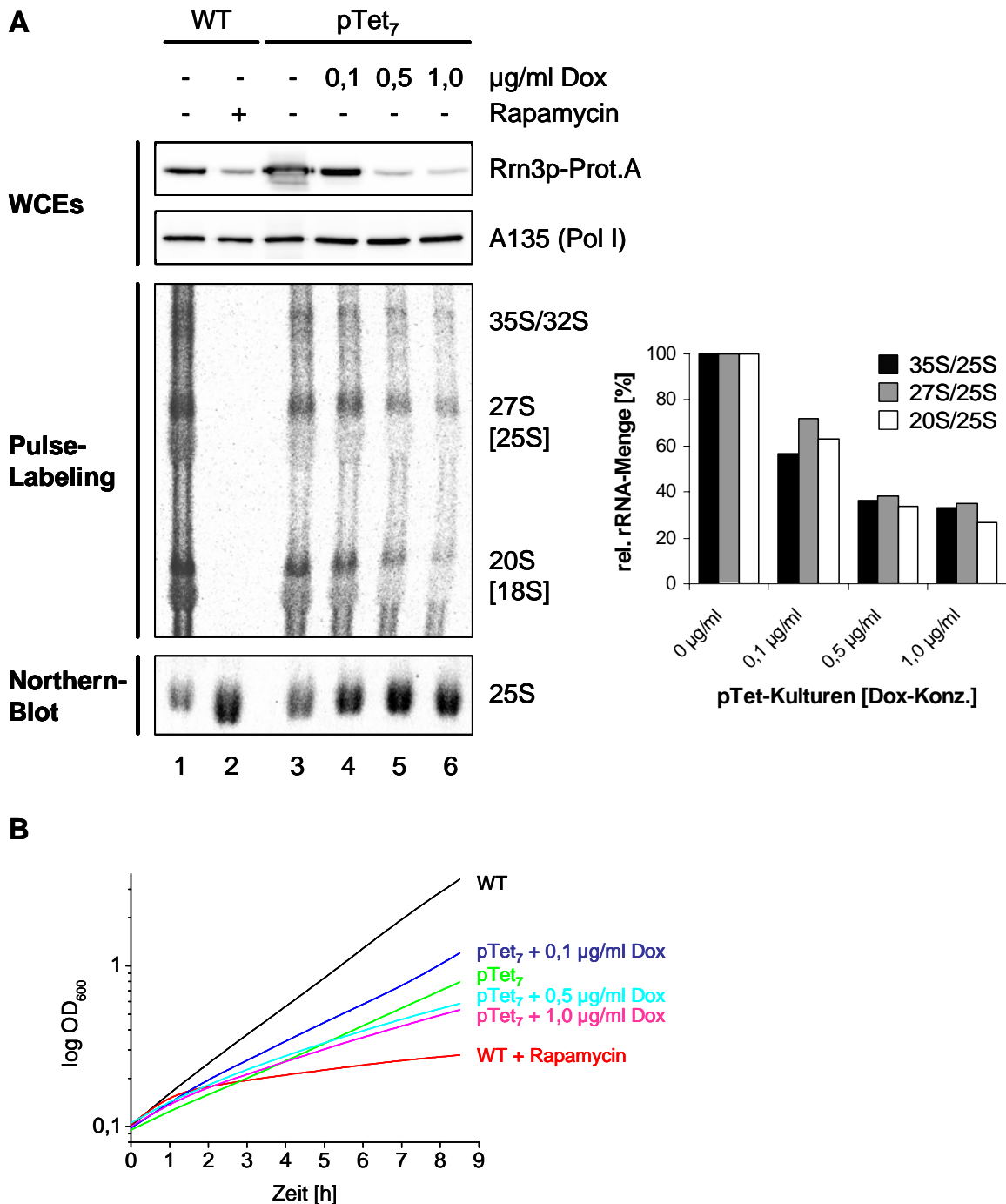


Abb. 2.8: Einfluss verschiedener Rrn3p-Mengen auf die rRNA-Syntheserate und das Hefewachstum.

(A) 17 h nachdem früh-logarithmische Kulturen des Stammes pTet₇-Rrn3-Prot.A mit 0, 0,1, 0,5 und 1 µg/ml Doxycyclin versetzt worden waren, wurden die Ansätze sowie zwei BSY420-Rrn3-Prot.A-Kulturen (WT), wovon eine 60 min lang mit 200 ng/ml Rapamycin behandelt worden war, aufgeteilt. Jeweils ein Aliquot wurde unter Hochsalzbedingungen aufgeschlossen, sodass mit den WCEs (30 µg) eine Western-Blot-Analyse durchgeführt werden konnte. Parallel dazu wurden die restlichen Hefen einem 15-minütigen Pulse-Labeling mit 20 µCi [5, 6-³H]-Uracil ausgesetzt. 20 % der aus den Zellen isolierten Gesamt-RNA wurden in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Detektion der ³H-markierten rRNA-Spezies erfolgte mit Hilfe eines Phosphorimagers. Anschließend wurde die Membran mit einer gegen die Gesamt-25S-rRNA gerichteten ³²P-markierten Oligosonde hybridisiert (Northern-Blot). Zur Quantifizierung der 35S-, 27S- und 20S-rRNA-Signale und der ³²P-markierten Gesamt-25S-rRNA wurde die Image Gauge-Software von Fujifilm verwendet.

(B) Wachstumskinetiken der verschiedenen pTet₇-Kulturen. Die einzelnen Ansätze (Start-OD₆₀₀ ≈ 0,1) wurden aus wachsenden üN-Kulturen angeimpft, die die gleichen Dox-Mengen enthielten. Wachsende und mit 200 ng/ml Rapamycin behandelte BSY420-Rrn3-Prot.A-Zellen (WT) wurden zu Vergleichszwecken in das Experiment miteinbezogen.

Wie dem Western-Blot (WCEs) in Abb. 2.8 A zu entnehmen ist, wurde das Rrn3p-Prot.A-Fusionsprotein im TetO-Promotor-Stamm mit Dox-Konzentrationen von 0,5 und 1,0 µg/ml (Spuren 5 und 6) auf ein Niveau herunterreguliert, das geringfügig unter demjenigen der rapamycin-behandelten WT-Zellen lag (Spur 2). Bei einer Dox-Konzentration von 0,1 µg/ml (Spur 4) wurde in etwa das Niveau der wachsenden WT-Hefen erreicht (Spur 1), wohingegen die unbehandelten pTet₇-Zellen den Faktor stark überexprimierten (Spur 3). Der darunter abgebildete RNA-Blot (Pulse-Labeling) zeigt neben der 35S-prä-rRNA, dem Primärtranskript der RNA-Polymerase I, auch einige Prozessierungsprodukte (32S-, 27S- und 20S-rRNA). Die neusynthetisierte 25S- und 18S-rRNA konnte hingegen nicht detektiert werden, da die Signale von einem Überschuss an unmarkierter rRNA überdeckt wurden.

Wie erwartet fand in den mit Rapamycin behandelten WT-Hefen, in denen eine deutliche Reduktion der Rrn3p-Menge beobachtet werden konnte, keine rRNA-Neusynthese mehr statt (Spur 2). Im Gegensatz dazu wurden Herstellung und Prozessierung der 35S-rRNA in den pTet₇-Kulturen, die ähnlich geringe Rrn3p-Mengen aufwiesen, nicht eingestellt (Spuren 5 und 6). Allerdings schien in den mit 0,5 und 1,0 µg/ml Dox behandelten Zellen insgesamt weniger rRNA synthetisiert worden zu sein als in den beiden anderen pTet₇-Kulturen (Spuren 3 und 4). Um den Effekt der Rrn3p-Menge auf die rRNA-Syntheserate exakt beurteilen zu können, wurden die 35S-, 27S- und 20S-rRNA-Signale quantifiziert und gegen die jeweilige, mittels Northern-Blot bestimmte Gesamt-25S-rRNA-Menge abgeglichen. Dabei wurde deutlich, dass die pTet₇-Kulturen, in denen stark reduzierte Rrn3p-Mengen nachgewiesen wurden (Spuren 5 und 6), nur etwa halb so viel rRNA neu hergestellt hatten wie die pTet₇-Zellen mit nahezu physiologischer Rrn3p-Expression (Spur 4). Diese wiederum enthielten weniger neu synthetisierte rRNA als die Hefen, die den Faktor überexprimierten (Spur 3). [Anmerkung: Die rRNA-Syntheseraten der verschiedenen pTet₇-Kulturen können nicht mit denjenigen der wachsenden WT-Zellen verglichen werden, da die beiden Stämme unterschiedliche Genotypen besitzen.]

Demnach scheint die in den Hefen vorkommende Rrn3p-Menge die Syntheserate der RNA-Polymerase I direkt zu beeinflussen. Je weniger Rrn3p in den Zellen vorliegt, desto weniger rRNA wird synthetisiert. Umgekehrt wird bei einer Überexpression des Faktors mehr rRNA hergestellt. Da in den pTet₇-Kulturen mit reduzierter Rrn3p-Expression die rRNA-Synthese zwar herunterreguliert aber nicht gänzlich eingestellt wurde, kann ferner geschlussfolgert werden, dass die in wachstumsarretierten Hefen stattfindende Inhibition der rRNA-Synthese nicht ausschließlich auf den zu Beginn dieser Arbeit beobachteten Rrn3p-Abbau zurückzuführen ist. Bei ungünstigen Umweltbedingungen könnte aus der Rrn3p-Degradation allerdings eine Abschwächung der Pol I-Transkription resultieren.

Die von der Rrn3p-Menge beeinflussten unterschiedlichen rRNA-Syntheseraten spiegelten sich teilweise im Wachstumsverhalten der pTet₇-Kulturen wider. Wie den Wachstumskinetiken in Teilabbildung B zu entnehmen ist, näherte sich diejenige pTet₇-Kultur, die den Faktor auf nahezu physiologisches Niveau exprimierte (pTet₇ + 0,1 µg/ml Dox), am stärksten den wachsenden WT-Zellen an. Die beiden Kulturen, die sich durch stark reduzierte Rrn3p-Mengen und niedrigere rRNA-Syntheseraten auszeichneten (pTet₇ + 0,5 bzw. 1,0 µg/ml Dox), wuchsen hingegen deutlich

langsamer. Interessanterweise zeigten auch die Rrn3p-überexprimierenden Zellen (pTet₇ ohne Dox) trotz leicht verstärkter Pol I-Transkription ein langsames Wachstum als die Hefen mit physiologischer Rrn3p-Menge. Diesem bereits auf Agarplatten beobachteten Phänotyp des TetO-Promotor-Stammes nach zu urteilen, scheint optimales Hefewachstum von einem ganz bestimmten, nicht zu niedrigen, aber auch nicht zu hohen Rrn3p-Expressionsniveau abzuhängen.

Um sichergehen zu können, dass wachstumsarretierte Hefen die rRNA-Synthese nicht allein aufgrund reduzierter Rrn3p-Mengen einstellen, wurde in einem weiteren Experiment eine früh-logarithmische pTet₇-Rrn3-Prot.A-Kultur zunächst 18 Stunden lang mit 0,2 µg/ml Doxycyclin behandelt, bevor ein Teil der Zellen für die Dauer von 20 und 120 Minuten zusätzlich mit Rapamycin versetzt wurde. Wachsende WT-Hefen erfuhren zu Vergleichszwecken die gleiche Behandlung. Anschließend wurden wiederum die in den einzelnen Kulturen vorliegenden Rrn3p-Prot.A-Mengen und rRNA-Syntheseraten miteinander verglichen.

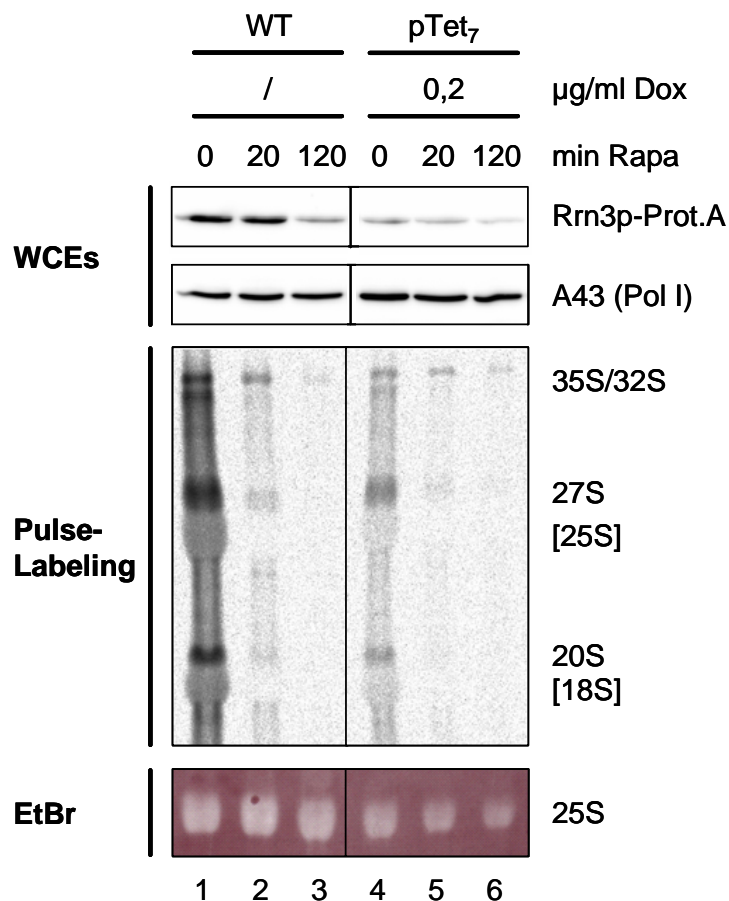


Abb. 2.9: Rapamycinbehandlung einer pTet₇-Kultur, in der die Rrn3p-Expression auf das Niveau wachstumsarretierter WT-Hefen herunterreguliert wurde.

Eine pTet₇-Rrn3-Prot.A-Kultur, welche 18 h mit 0,2 µg/ml Doxycyclin behandelt worden war, sowie wachsende BSY420-Rrn3-Prot.A-Zellen (WT) wurden für die Dauer von 20 und 120 min mit 200 ng/ml Rapamycin versetzt bzw. unbehandelt weiterkultiviert. Im Anschluss an die jeweilige Behandlung wurden die Ansätze aufgeteilt. Ein Teil der Kulturen wurde unter Hochsalzbedingungen aufgeschlossen, sodass die WCEs (30 µg) in einem Western-Blot analysiert werden konnten. Mit den restlichen Hefen wurde ein 15-minütiges Pulse-Labeling mit 20 µCi [5, 6-³H]-Uracil durchgeführt. Von der aus den Zellen extrahierten Gesamt-RNA wurden gleiche Mengen (bezogen auf das EtBr-Signal der 25S-rRNA) in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Die ³H-markierten rRNA-Spezies wurden mit Hilfe eines Phosphorimagers sichtbar gemacht.

Wie auf dem Western-Blot (WCEs) in Abb. 2.9 zu erkennen ist, konnte die Rrn3p-Expression in der pTet₇-Kultur auf das Niveau der wachstumsinhibierten WT-Zellen herunterreguliert werden (vgl. Spuren 3 und 4), bevor durch die Rapamycinzugabe eine weitere Reduktion der Rrn3p-Menge erreicht wurde (Spur 6). Der unter dem Western-Blot abgebildete RNA-Blot (Pulse-Labeling) zeigt, dass in den pTet₇-Hefen die rRNA-Synthese trotz stark reduzierter Rrn3p-Expression nicht eingestellt wurde (Spur 4). Die Neusynthese der ribosomalen RNAs wurde im pTet₇- ebenso wie im WT-Stamm erst nach Rapamycinzugabe reprimiert (Spuren 5 und 6), was verdeutlicht, dass in *S. cerevisiae* die rRNA-Produktion unter ungünstigen Umweltbedingungen nicht allein aufgrund reduzierter Rrn3p-Proteinmengen inhibiert wird. Angesichts der Tatsache, dass sich Zellen mit verschiedenen Rrn3p-Expressionsniveaus durch unterschiedliche rRNA-Syntheseraten auszeichneten, könnte der Rrn3p-Abbau allerdings zur Herunterregulierung der Pol I-Transkription in wachstumsarretierten Hefen beitragen. Darüber hinaus deuten die in diesem Kapitel präsentierten Daten stark darauf hin, dass das Rrn3p-Expressionsniveau nicht nur Auswirkungen auf die Syntheserate der Pol I hat, sondern davon unabhängig auch das Hefewachstum beeinflusst. Den mit dem Tetracyclin-regulierbaren pTet₇-Stamm durchgeführten Experimenten nach zu urteilen, können nur Hefen, die eine ganz bestimmte nicht zu niedrige, aber auch nicht zu hohe Rrn3p-Menge exprimieren, optimal wachsen.

2.4 Charakterisierung der Deletionsmutante pNOP1-Rrn3-ΔN-Prot.A

Vor einigen Jahren wurde im Tschochner-Labor ein Peptid-Antikörper hergestellt, der sich gegen die ersten 10 N-terminalen Aminosäuren des Rrn3p richtet (α -Rrn3p-NT). Überraschenderweise konnte mit diesem Antikörper lediglich das in wachsenden Zellen exprimierte, nicht aber das in stationären Hefen vorkommende Protein immunpräzipitiert werden. Dies legte die Vermutung nahe, dass der N-Terminus des Faktors in Abhängigkeit vom Wachstumszustand der Zellen unterschiedlich modifiziert und somit für die wachstumsabhängige Regulation der RNA-Polymerase I-Transkription von Bedeutung sein könnte.

Um sicher zu gehen, dass das in stationären *S. cerevisiae*-Zellen vorliegende Rrn3p tatsächlich nicht mit dem α -Rrn3p-NT-Antikörper angereichert werden kann, sollten die Immunpräzipitationen in der vorliegenden Arbeit noch einmal wiederholt werden. Zur Durchführung des Versuchs wurden wachsende und stationäre Kulturen des Hefestammes BY4741-Rrn3-HA₃ (vgl. Kap. 2.3.2) verwendet. Die durch Hochsalzaufschluss gewonnenen Zellextrakte wurden zunächst einer Western-Blot-Analyse unterzogen, die der Quantifizierung der in den beiden Gesamtzellextrakten vorkommenden Rrn3p-Mengen diente (Ergebnis des Western-Blots nicht gezeigt). Wie sich dabei herausstellte, verfügten die stationären BY4741-Rrn3-HA₃-Zellen über 10-mal weniger Rrn3p als die wachsenden. Da in den IPs aber gleiche Rrn3p-Mengen präzipitiert werden sollten, wurde dementsprechend vom Extrakt der stationären Hefen die 10-fache Menge eingesetzt. Indem die Anreicherungen unter stringenten Bedingungen durchgeführt wurden, sollten unspezifische Protein-

Interaktionen mit der Affinitätsmatrix vermieden werden (siehe Fath et al., 2001). Zur Präzipitation des Faktors wurden sowohl der α -Rrn3p-NT- als auch ein monoklonaler α -HA-Antikörper verwendet. Zwei Ansätze ohne Immunglobuline dienten als Hintergrund-Kontrollen. Die sechs IPs wurden zusammen mit den Gesamtzellextrakten in dem in Abb. 2.10 gezeigten Western-Blot analysiert.

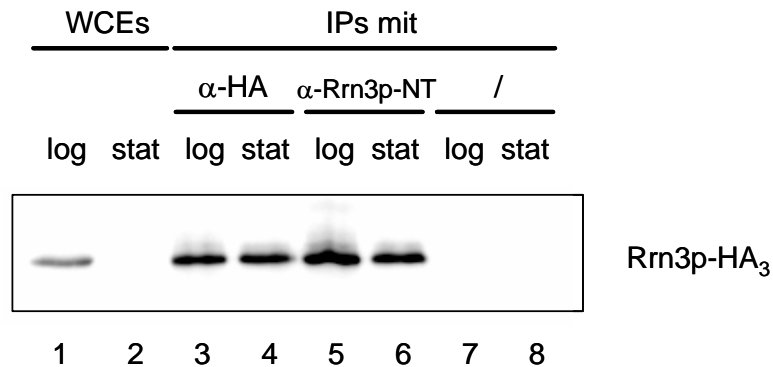


Abb. 2.10: Rrn3p-Präzipitation aus Gesamtzellextrakten wachsender und stationärer Hefen mit Hilfe des polyklonalen Peptid-Antikörpers α -Rrn3p-NT.

Aus wachsenden (log) und stationären (stat) Zellen des Stammes BY4741-Rrn3-HA₃ wurden mittels Hochsalzaufschluss Gesamtzellextrakte hergestellt. Zur Anreicherung des Rrn3p wurden 2 mg (log) bzw. 20 mg (stat) WCE unter stringenten Bedingungen (400 mM Ammoniumsulfat, 900 mM Kaliumacetat, 0,5 % NP40, 0,05 % Triton X-100) mit Protein G-Sepharose und α -HA (3F10) sowie mit Protein G-Sepharose und α -Rrn3p-NT inkubiert. Zwei Ansätze ohne Antikörper dienten als Kontrollen. Im Anschluss an mehrere Waschschrte mit 5 mM NH₄Ac (pH 5,0) und 1,5 M Kaliumacetat/0,5 % NP40 wurden die IPs und die WCEs (jeweils 40 μ g) in einem Western-Blot analysiert, welcher mit dem monoklonalen α -HA-Antikörper 12CA5 entwickelt wurde.

Man erkennt, dass beide Antikörper sowohl das in wachsenden Zellen exprimierte Rrn3p-HA₃ als auch das in stationären Hefen vorliegende Protein immunpräzipitieren konnten (Spuren 3-6). Während allerdings mit dem α -HA-Antikörper exakt gleiche Proteinmengen angereichert wurden (Spuren 3 und 4), wurde mit dem α -Rrn3p-NT-Antikörper das stationäre Rrn3p weniger effizient präzipitiert als das aus den wachsenden Zellen stammende Protein (Spuren 5 und 6). In den Spuren mit den Kontroll-Ansätzen wurde kein Rrn3p nachgewiesen (Spuren 7 und 8). Demnach könnte die Interaktion zwischen dem gegen die ersten 10 Aminosäuren des Rrn3p gerichteten Peptid-Antikörper und dem stationären Protein tatsächlich beeinträchtigt sein. Wie bereits erwähnt ließe sich die eingeschränkte Rrn3p-Antikörper-Wechselwirkung durch eine speziell in stationären Hefen auftretende N-terminale Modifikation des Faktors erklären, womit dem N-Terminus des Proteins möglicherweise eine wichtige Funktion in der wachstumsabhängigen Regulation der RNA-Polymerase I-Transkription zukäme.

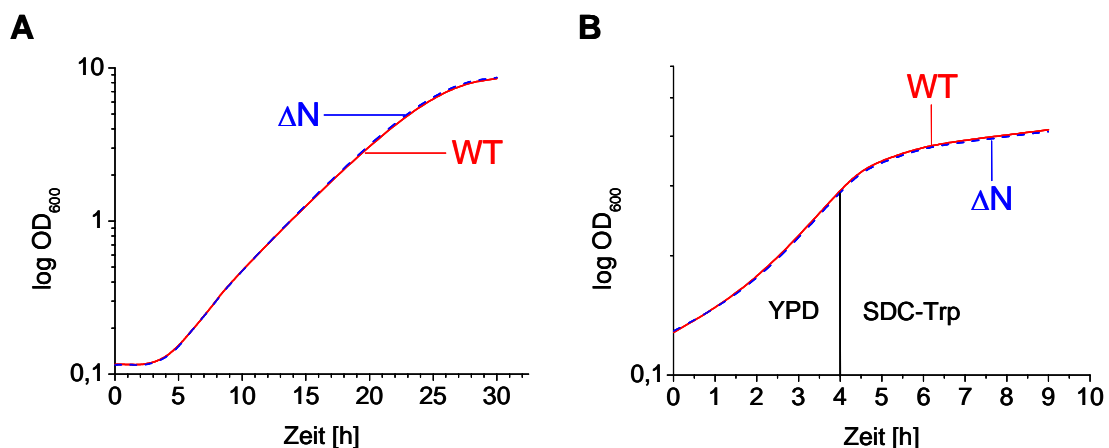
Um eine eventuelle Bedeutung des Rrn3p-N-Terminus für die wachstumsabhängige Regulation der Pol I-Transkription näher charakterisieren zu können, wurde auf den von Stephan Fath klonierten Hefe-Vektor pNOP1-RRN3- Δ 17-Prot.A zurückgegriffen. Dieser ermöglicht die Expression einer

Rrn3p-Version, der die ersten 17 N-terminalen Aminosäuren fehlen, unter der Kontrolle des NOP1-Promotors. C-terminal verfügt das trunkierte Protein über einen TEV-Protein A-HIS₇-Tag (kurz: Prot.A-Tag). Zu Vergleichszwecken wurde die WT-RRN3-Sequenz in den gleichen Vektor integriert. Anschließend wurden die beiden Konstrukte in einen Hefestamm mit disruptiertem endogenem RRN3-Gen („RRN3-shuffle-Stamm“) eingeschleust. In den resultierenden Stämmen pNOP1-Rrn3-Prot.A (WT) und pNOP1-Rrn3-ΔN-Prot.A (Δ17-Mutante) werden die beiden Rrn3p-Versionen (schematische Darstellung in Abb. 2.11) auf nahezu physiologischen Niveau exprimiert.



Abb. 2.11: Schematische Darstellung der in den Hefestämmen pNOP1-Rrn3-Prot.A und pNOP1-Rrn3-ΔN-Prot.A exprimierten Rrn3p-Versionen Rrn3p-Prot.A (WT) und Rrn3p-ΔN-Prot.A (Δ17-Mutante).

Bei von Stephan Fath durchgeführten Untersuchungen zeigte die ΔN-Mutante kein verändertes Wachstumsverhalten gegenüber dem isogenen WT-Stamm (Fath, 2002). Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurden in dieser Arbeit nochmals die Wachstumskurven der beiden Stämme ermittelt, wobei sowohl stationäre (Abb. 2.12 A) als auch üN-Vorkulturen (Ergebnis nicht gezeigt) zum Animpfen benutzt wurden. In beiden Fällen stimmten die Wachstumskinetiken genau überein. Des Weiteren wurde mit den beiden Tryptophan-auxotrophen Stämmen eine Tryptophandepletion durchgeführt. Wie in Abb. 2.12 B zu erkennen ist, führte dies sowohl im Wildtyp als auch in der ΔN-Mutante zu einer raschen Wachstumsinhibition. Zusätzlich wurden die beiden Stämme auf temperaturabhängige Abweichungen im Wachstumsverhalten hin überprüft. Der hierzu durchgeführte Tüpfeltest ließ weder bei 30 °C noch bei erniedrigter (24 °C) bzw. erhöhter (37 °C) Temperatur Wachstumsunterschiede erkennen (Abb. 2.12 C).



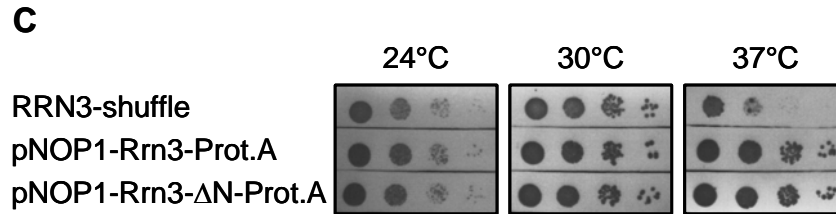


Abb. 2.12: Wachstumsverhalten der Rrn3-ΔN-Mutante und des isogene WT-Stammes.

(A) Wachstumskinetiken der Stämme pNOP1-Rrn3-Prot.A (WT) und pNOP1-Rrn3-ΔN-Prot.A (ΔN) in YPD-Medium. Die beiden Kulturen (Start-OD₆₀₀ ≈ 0,1) wurden aus stationären Vorkulturen angeimpft.

(B) Wachstumskurven der Stämme pNOP1-Rrn3-Prot.A (WT) und pNOP1-Rrn3-ΔN-Prot.A (ΔN) vor und nach Überführung der Zellen von YPD- in SDC-Trp-Medium.

(C) Tüpfeltest mit den Stämmen pNOP1-Rrn3-Prot.A und pNOP1-Rrn3-ΔN-Prot.A. Die YPD-Platten wurden 48 h lang bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Der „RRN3-shuffle-Stamm“ NOY604-Rrn3-URA wurde zu Vergleichszwecken in das Experiment mit einbezogen.

Anschließend sollte die Stabilität der trunkierten Rrn3p-Version (Rrn3p-ΔN-Prot.A) mit der des Volllängenproteins verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden wachsende Kulturen des WT- und des ΔN-Stammes zunächst einer Tryptophandepletion unterzogen, bevor mit den mittels Hochsalzaufschluss hergestellten Gesamtzellextrakten eine Western-Blot-Analyse durchgeführt wurde. Wie in Abb. 2.13 zu erkennen ist, wurde nach Austausch des Mediums lediglich das WT-Rrn3p-Prot.A herunterreguliert (Spuren 1-3), die trunkierte Version Rrn3p-ΔN-Prot.A wurde hingegen nicht abgebaut (Spuren 4-6).

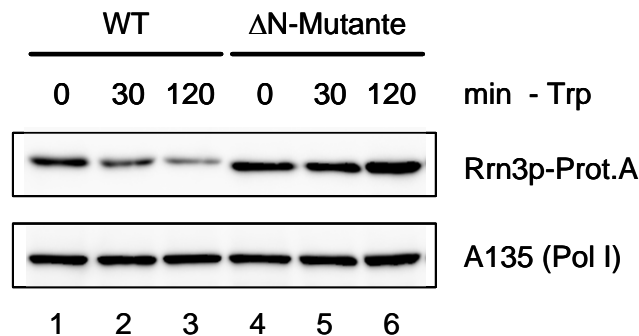


Abb. 2.13: Auswirkung einer Aminosäuredepletion auf die Stabilität der Prot.A-getagten Rrn3p-Versionen Rrn3p-Prot.A (WT) und Rrn3p-ΔN-Prot.A.

Zellen der Hefestämme pNOP1-Rrn3-Prot.A (WT) und pNOP1-Rrn3-ΔN-Prot.A (ΔN-Mutante) wurden unmittelbar vor (0 min) sowie 30 und 120 min nach Durchführung einer Tryptophandepletion geerntet und unter Hochsalzbedingungen aufgeschlossen. Gleiche Mengen WCE (30 μg) wurden in einem 8 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Für den immunologischen Nachweis wurden PAP-Immunkomplexe zur Detektion der Rrn3p-Versionen sowie ein Pol I-spezifischer α-A135-Antikörper verwendet.

Diese überraschende Beobachtung ließ zwei Schlussfolgerungen zu: Einerseits konnte aufgrund der in Abb. 2.12 gezeigten Wachstumskinetiken ausgeschlossen werden, dass die ersten 17 Aminosäuren des Rrn3p bei der Initiation der Pol I-Transkription eine essenzielle Rolle spielen.

Angesichts der in aminosäuredepletierten Hefen beobachteten erhöhten Stabilität des verkürzten Rrn3p könnte der deletierte Bereich aber, wie bereits vermutet, für die wachstumsabhängige Regulation der rRNA-Synthese von Bedeutung sein.

Um auf breiter Basis überprüfen zu können, ob der N-Terminus des Rrn3p für die wachstumsabhängige Regulation der RNA-Polymerase I-Transkription benötigt wird, sollte zunächst das Stammrepertoire erweitert werden. Zu diesem Zweck wurde in den beiden RRN3-Konstrukten der TEV-Protein A-HIS₇-Tag gegen einen dreifachen HA-Tag ausgetauscht (Erläuterung der Klonierungsstrategie in Kap. 4.7.11.2). Anschließend wurde mit den neuen Stämmen (vgl. Kap. 4.5.14.3) eine Tryptophandepletion durchgeführt. Der in Abb. 2.14 dargestellte Western-Blot zeigt den unerwarteten Ausgang dieses Versuchs. Im Gegensatz zum Protein A-Fusionsprotein wurde das HA₃-getagte Rrn3p-ΔN (Spuren 4-6) nach Austausch des Mediums genauso schnell degradiert wie der entsprechende Wildtyp (Spuren 1-3).

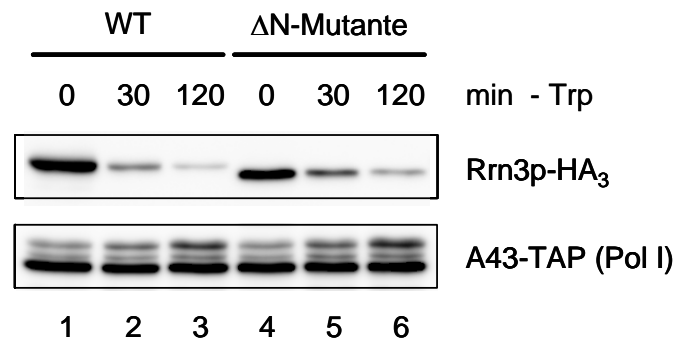


Abb. 2.14: Auswirkung einer Aminosäuredepletion auf die Stabilität der HA₃-getagten, trunkierten Rrn3p-Version Rrn3p-ΔN-HA₃.

Mit wachsenden Zellen der Stämme pNOP1-A43-TAP-Rrn3-HA₃ (WT) und pNOP1-A43-TAP-Rrn3-ΔN-HA₃ (ΔN-Mutante) wurde eine Tryptophandepletion durchgeführt. Unmittelbar vor (0 min) sowie 30 und 120 min nach Austausch des Mediums wurden die Zellen geerntet. 30 µg der mittels Hochsalzaufschluss hergestellten WCEs wurden in einem 8 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Während die Rrn3p-Versionen mit Hilfe eines monoklonalen α-HA-Antikörpers (12CA5) detektiert wurden, wurde die TAP-getagte Pol I-Untereinheit A43 mit PAP-Immunkomplexen nachgewiesen.

Folglich ist die in Abb. 2.13 dokumentierte erhöhte Stabilität des Prot.A-getagten Rrn3p-ΔN nicht allein auf die N-terminale Deletion zurückzuführen. Vielmehr scheinen sowohl die Deletion als auch der Prot.A-Tag dazu beizutragen, dass das trunkierte Fusionsprotein in wachstumsarretierten Hefezellen nicht abgebaut wird. Während die zu Beginn dieses Kapitels gezeigten Rrn3p-Immunpräzipitationen vermuten lassen, dass der N-Terminus des Faktors für die wachstumsabhängige Regulation der Pol I-Transkription von Bedeutung sein könnte, spricht der Phänotyp der ΔN-HA₃-Mutante eher dagegen. Aufgrund dieser widersprüchlichen Ergebnisse wurde auf eine weitergehende Analyse des Rrn3p-N-Terminus verzichtet und auch nicht nach einer möglichen N-terminalen Modifikation gesucht.

2.5 Bedeutung des Rrn3p-Abbaus für den in wachstumsinhibierten Hefen stattfindenden Verlust der Pol I-Rrn3p-Komplexe

Den in Kap. 2.3 präsentierten Ergebnissen nach zu urteilen, könnte der zu Beginn dieser Doktorarbeit beobachtete proteasomabhängige Rrn3p-Abbau mit dafür verantwortlich sein, dass in wachstumsarretierten Hefezellen die RNA-Polymerase I-Transkription reprimiert wird. Bisherige Studien zur Regulation der Pol I-Transkription waren übereinstimmend zu dem Ergebnis gekommen, dass diese über die Menge der initiationskompetenten Pol I-Rrn3p-Komplexe moduliert wird. Daher lag es auf der Hand zu untersuchen, ob der in wachstumsinhibierten Hefen stattfindende Verlust der Pol I-Rrn3p-Komplexe auf den Abbau des Rrn3p zurückzuführen ist. Um feststellen zu können, ob zwischen der Rrn3p-Degradation und dem Komplexverlust ein kausaler Zusammenhang besteht, wurde auf den im vorigen Kapitel eingeführten Hefestamm pNOP1-Rrn3- Δ N-Prot.A zurückgegriffen, dessen trunkierte Rrn3p-Version bei Aminosäureentzug nicht abgebaut wird. Des Weiteren wurde die Pol I-Rrn3p-Interaktion in der Proteasom-ts-Mutante cim3-1 analysiert, in der die Proteolyse des Faktors verhindert werden kann.

2.5.1 Charakterisierung der RNA-Polymerase I-Rrn3p-Interaktion mit Hilfe von Gelfiltrationsexperimenten

Zunächst wurden zur näheren Charakterisierung der Pol I-Rrn3p-Interaktion Gelfiltrations-experimente durchgeführt. Normalerweise wird diese auch Größenausschluss-Chromatographie genannte Methode zur Auftrennung von Proteingemischen angewandt. Daneben kann das Verfahren aber auch zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen herangezogen werden, da interagierende Proteine von den Gelfiltrationssäulen koeluieren. Mirko Bier war es im Rahmen seiner Doktorarbeit gelungen, Gesamtzellextrakte von wachsenden Hefen unter relativ stringenten Bedingungen (1,5 M Kaliumacetat, 0,05 % Tween 20) über eine Superose[®] 6-Säule zu fraktionieren. Dabei teilte sich das darin enthaltene Rrn3p in drei Subpopulationen auf: Etwa 25 % des Rrn3p eluierten zusammen mit der RNA-Polymerase I im mittleren Molekulargewichtsbereich. Mehr als die Hälfte des Proteins, unkomplexierte Rrn3p-Monomere, wurde in niedermolekularen Fraktionen nachgewiesen. Der Rest (< 25 %) war in hochmolekularen Fraktionen enthalten, wobei noch unklar ist, ob es sich hierbei um eine physiologische Rrn3p-Population oder um ein Artefakt handelt (Bier, 2004; Bier et al., 2004).

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden zunächst die Rrn3- Δ N-Mutante und der isogene Wildtyp einer Gelfiltrationsanalyse unterzogen. Die beiden Stämme wurden bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase in YPD-Medium kultiviert, bevor mit einem Teil der Zellen eine zweistündige Tryptophandepletion durchgeführt wurde. Anschließend wurden gleiche Mengen der mittels Hochsalzaufschluss hergestellten Gesamtzellextrakte unter Anwendung des von Mirko Bier etablierten Protokolls auf einer Superose[®] 6-Säule aufgetrennt. Die für die Fragestellung relevanten

Fractionen und ein Teil der Inputs wurden in zwei Western-Blots analysiert, welche in Abb. 2.15 dargestellt sind.

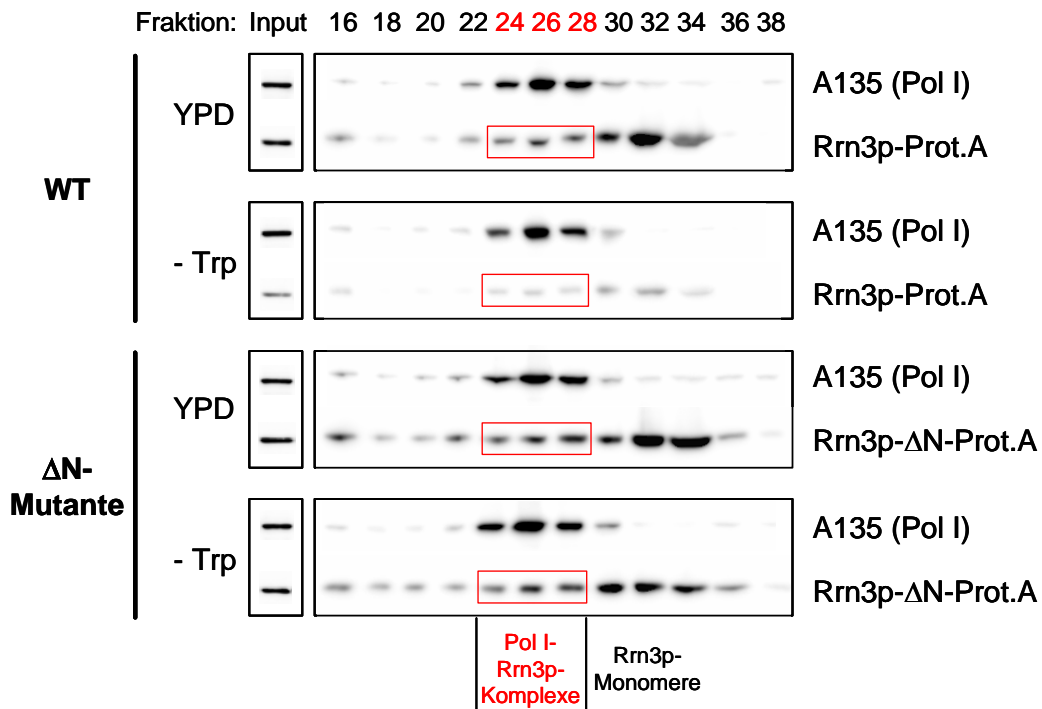


Abb. 2.15: Gelfiltrationsanalyse zur Charakterisierung der Pol I-Rrn3p-Interaktion in der Rrn3-ΔN-Mutante.

Nachdem YPD-Kulturen der Stämme pNOP1-Rrn3-Prot.A (WT) und pNOP1-Rrn3-ΔN-Prot.A (ΔN-Mutante) die logarithmische Wachstumsphase erreicht hatten, wurde ein Teil der Zellen für die Dauer von 2 h in SDC-Trp-Medium überführt. 900 µg der mittels Hochsalzaufschluss hergestellten WCEs wurden anschließend unter stringenten Bedingungen (1,5 M Kaliumacetat, 0,05 % Tween 20) über eine Superose® 6-Säule fraktioniert. Von jeder zweiten der relevanten 500 µl-Fractionen wurden 250 µl TCA-gefällt und zusammen mit 3,3 % der Inputs in 8 %igen SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Bei der im Anschluss durchgeführten Western-Blot-Analyse wurde für den Pol I-Nachweis ein polyklonaler α-A135-Antikörper verwendet, während die beiden Rrn3p-Prot.A-Versionen mit Hilfe von PAP-Immunkomplexen detektiert wurden.

Die RNA-Polymerase I wurde entsprechend ihrer Gesamtmasse von ca. 600 kDa in den Fraktionen 24-28 nachgewiesen. In denselben Fraktionen waren durchschnittlich 20 % des Rrn3p enthalten. In den Fraktionen 30-34 eluierten die freien Rrn3p-Prot.A-Monomere, deren Anteil an der Rrn3p-Gesamtmenge fast 70 % betrug. Im höheren Molekulargewichtsbereich konnte dementsprechend nur sehr wenig Protein detektiert werden. Unterschiedliche Zellaufschlusstechniken und Quantifizierungsmethoden könnten dafür verantwortlich sein, dass dieses Ergebnis von den von Mirko Bier vorgelegten Daten abweicht. Außerdem wurden die hier abgebildeten Gelfiltrationen in einer FPLC-Anlage durchgeführt, wohingegen vorher ein Smart-System verwendet wurde, welches sich durch eine andere Auflösung auszeichnet.

In Übereinstimmung mit den in Kap. 2.4 präsentierten Daten verfügten die wachstumsarretierten WT-Hefen über insgesamt geringere Mengen Rrn3p als die wachsenden Zellen. Wie in Reihe 2 zu erkennen ist, waren von der Degradation des Faktors sowohl das mit der Polymerase koeluiierende Protein (Fraktionen 24-28) als auch die Rrn3p-Monomere (Fraktionen 30-34) betroffen. Im

Gegensatz dazu wiesen die wachstumsinhibierten Zellen der Deletionsmutante nicht nur gleich viel Gesamt-Rrn3p- Δ N-Prot.A, sondern auch gleich große Rrn3p-Subpopulationen auf wie die wachsenden Δ N-Hefen (Reihen 3 und 4, Fraktionen 24-28). Somit wurde in der Mutante, in der kein Rrn3p-Abbau stattfindet, die Komplexmenge anscheinend nicht herunterreguliert.

Um diese interessante Beobachtung besser einschätzen zu können, wurden zusätzlich auch die Gesamtzellextrakte der Proteasom-ts-Mutante und des isogenen WT-Stamms über die Superose[®] 6-Säule aufgetrennt (Abb. 2.16).

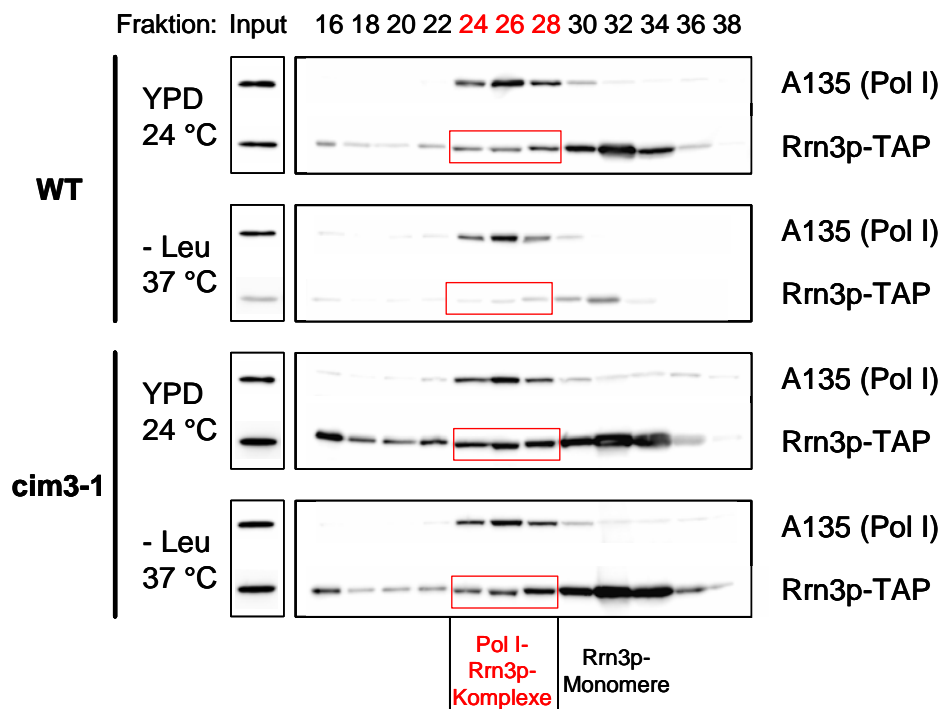


Abb. 2.16: Gelfiltrationen zur Untersuchung des Pol I-Rrn3p-Komplexes in der Proteasom-ts-Mutante. Bei 24 °C wachsende Zellen der Stämme YWO365-Rrn3-TAP (WT) und cim3-1-Rrn3-TAP (Proteasom-ts-Mutante) wurden von YPD- in SDC-Leu-Medium überführt und gleichzeitig für die Dauer von 2 h auf eine Temperatur von 37 °C gebracht. Von den mittels Hochsalzaufschluss hergestellten WCEs wurden jeweils 900 µg in Gegenwart von 1,5 M Kaliumacetat und 0,05 % Tween 20 über eine Superose[®] 6-Säule aufgetrennt. Die Hälfte (250 µl) von jeder zweiten Fraktion wurde TCA-gefällt und zusammen mit 3,3 % des jeweiligen Inputs in einem Western-Blot analysiert. Dabei kamen ein gegen die Pol I-Untereinheit A135 gerichteter Kaninchen-Antikörper sowie PAP-Immunkomplexe für den Rrn3p-Nachweis zum Einsatz.

Erwartungsgemäß nahm im Wildtyp nicht nur die Rrn3p-TAP-Gesamtmenge, sondern auch die Menge des gemeinsam mit der Polymerase eluierenden Proteins stark ab, als die Zellen einer zweistündigen Leucindepletion unterzogen und gleichzeitig auf eine Temperatur von 37 °C gebracht wurden (Reihen 1 und 2, Fraktionen 24-28). In der inaktivierten cim3-1-Mutante konnte hingegen insgesamt kein Rrn3p-Verlust festgestellt werden, und auch die Menge des mit der Polymerase koeluierenden Rrn3p verringerte sich nur geringfügig (Reihen 3 und 4, Spuren 24-28). Demnach schien sich die Menge der Pol I-Rrn3p-Komplexe in den wachstumsinhibierten Zellen der

Proteasom-ts-Mutante ebenfalls nicht verändert zu haben. Der zu Beginn dieser Doktorarbeit beobachtete Rrn3p-Abbau könnte somit für den in wachstumsarretierten Hefen stattfindenden Komplexverlust verantwortlich sein.

2.5.2 Untersuchung der RNA-Polymerase I-Rrn3p-Interaktion mit Hilfe von Koimmunpräzipitationen

Die in Kap. 2.5.1 gezeigten Gelfiltrationsexperimente ließen vermuten, dass in der Hefe die Menge der RNA-Polymerase I-Rrn3p-Komplexe von der in den Zellen vorhandenen Rrn3p-Gesamtmenge abhängen könnte. Da es bei den Fraktionierungen allerdings nicht gelungen war, das mit der Pol I koeluiierende Rrn3p eindeutig von den Rrn3p-Monomeren abzutrennen und daher beiden Rrn3p-Populationen nicht exakt quantifiziert werden konnten, musste die Pol I-Rrn3p-Interaktion mit Hilfe einer zweiten Methode analysiert werden.

Neben der Gelfiltrationschromatographie eignen sich Koimmunpräzipitationen (Co-IPs), um Protein-Protein-Wechselwirkungen nachzuweisen. Hierbei wird eine bestimmte Komponente eines Proteingemischs mit Hilfe eines spezifischen matrixgebundenen Antikörpers immunpräzipitiert. Faktoren, die mit dem Zielprotein stabil assoziiert sind, werden auf diese Weise ebenfalls angereichert (koprazipitiert) und können anschließend in einem Western-Blot nachgewiesen werden. Der Pol I-Rrn3p-Komplex kann aus Gesamtzellextrakten sowohl über das Rrn3p als auch über die einzelnen Pol I-Untereinheiten angereichert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Komplex nach Möglichkeit über die Pol I-Komponente A43 präzipitiert. Da die Polymerase im Gegensatz zum WT-Rrn3p bei einem Wachstumsarrest nicht degradiert wird, können so aus verschiedenen Extrakten gleiche Mengen Pol I isoliert und die koprazipitierten Rrn3p-Mengen quantitativ miteinander verglichen werden.

Um die Pol I-Rrn3p-Interaktion in der Rrn3-Deletionsmutante untersuchen zu können, wurde auf die Stämme pNOP1-Rrn3-Prot.A-A43-HA₃ und pNOP1-Rrn3-ΔN-Prot.A-A43-HA₃ zurückgegriffen (vgl. Kap. 2.7). Nachdem YPD-Kulturen des Wildtyps und der Mutante die logarithmische Wachstumsphase erreicht hatten, wurde ein Teil der Zellen für die Dauer von zwei Stunden in SCD-Trp-Medium überführt. Wachsende Zellen der Stämme pNOP1-Rrn3-Prot.A und pNOP1-Rrn3-ΔN-Prot.A dienten als Hintergrund-Kontrollen. Bevor die Kulturen geerntet wurden, wurden sie mit Formaldehyd gecrosslinkt. Anschließend wurden unter Verwendung eines stringenten Lysepuffers Zellextrakte hergestellt. Zur Präzipitation der HA₃-getagten A43 wurde ein monoklonaler α-HA-Antikörper verwendet. Bei den Waschschritten kamen neben dem Lysepuffer zwei ebenfalls stringente Waschpuffer zum Einsatz, sodass unspezifische Protein-Wechselwirkungen mit der Affinitätsmatrix weitestgehend verhindert wurden (Protokoll von Hecht und Grunstein, 1999). Nach Aufhebung des Crosslinks wurden die Präzipitate (α-HA-IPs) und die entsprechenden Extrakte (Inputs) einer Western-Blot-Analyse unterzogen (Abb. 2.17 A).

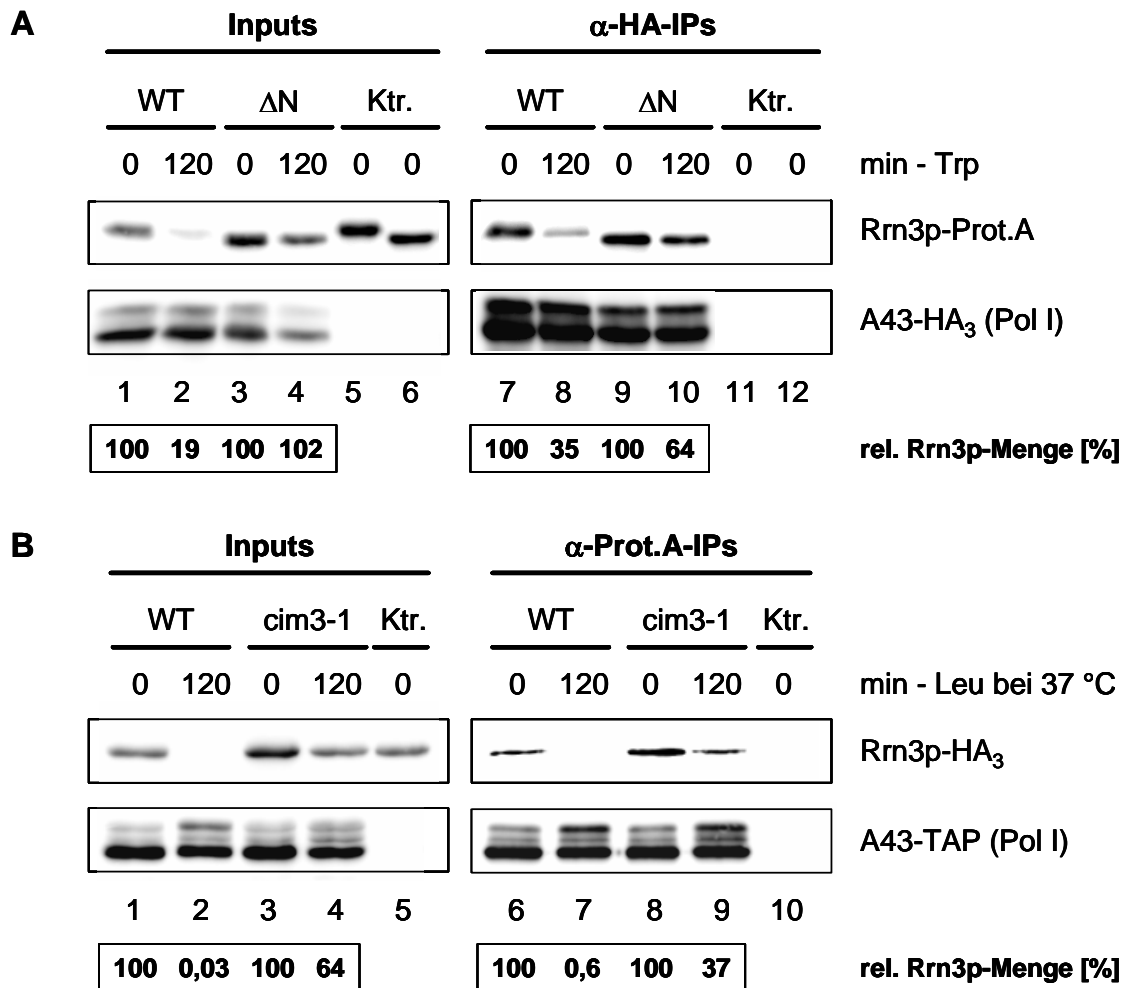


Abb. 2.17: Charakterisierung der Pol I-Rrn3p-Interaktion in der Rrn3- ΔN - und der Proteasom-ts-Mutante mit Hilfe von Koimmunpräzipitationen.

(A) Die Stämme pNOP1-Rrn3-Prot.A-A43-HA₃ (WT) und pNOP1-Rrn3- ΔN -Prot.A-A43-HA₃ (ΔN) wurden bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase in YPD kultiviert, bevor ein Teil der Hefen in SDC-Trp-Medium transferiert wurde. Nach 2 h wurden die Zellen ebenso wie logarithmische pNOP1-Rrn3-Prot.A- und pNOP1-Rrn3- ΔN -Prot.A-Kulturen (Ktr.) mit 1 % Formaldehyd gecrosslinkt, geerntet, in einem stringenten Puffer aufgeschlossen und sonifiziert. Zur Anreicherung der HA₃-getagten Pol I-Untereinheit A43 wurden anschließend je 250 μ l Extrakt mit einem monoklonalen α -HA-Antikörper (3F10) und Protein G-Sepharose inkubiert. Die Präzipitate wurden mehrmals stringent gewaschen und zur Revertierung des Crosslinks auf 95 °C erhitzt. Im Anschluss wurden 50 % der Co-IPs und 1 % der Inputs in einem Western-Blot analysiert, wobei die Rrn3p-Prot.A-Versionen mit PAP-Immunkomplexen und die HA₃-getagte A43 mit einem monoklonalen α -HA-Antikörper (3F10) sichtbar gemacht wurden.

(B) Bei 24 °C in Vollmedium wachsende Zellen der Stämme YWO365-A43-TAP-Rrn3-HA₃ (WT) und cim3-1-A43-TAP-Rrn3-HA₃ (ts) wurden in 37 °C warmes SDC-Leu-Medium überführt. Unmittelbar vor (0 min) und 2 h nach Austausch des Mediums wurden die Hefen sowie eine logarithmische cim3-1-Rrn3-HA₃-Kultur (Ktr.) geerntet und in einem Hochsalzpuffer aufgeschlossen. Zur Anreicherung der TAP-getagten A43 wurden je 1,5 mg WCE unter stringenten Bedingungen (400 mM Ammoniumsulfat, 750 mM Kaliumacetat, 0,5 % NP40, 0,05 % Triton X-100) mit IgG-Sepharose inkubiert. Im Anschluss an mehrere Waschschritte mit 5 mM NH₄Ac (pH 5,0) und 1,5 M Kaliumacetat/0,5 % NP40 wurden 50 % der Präzipitate und 1,6 % der Inputs einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Dabei wurden das HA₃-getagte Rrn3p mit einem monoklonalen α -HA-Antikörper (12CA5) und das A43-TAP-Fusionsprotein mit PAP-Immunkomplexen detektiert.

(A) und (B) Nach Quantifizierung der Rrn3p- und A43-Signale mit Hilfe der AIDA-Software von Raytest wurden die ermittelten Rrn3p- gegen die jeweiligen A43-Werte abgeglichen (relative Rrn3p-Menge).

Obwohl die verschiedenen Lysate unterschiedliche Mengen Gesamtprotein enthielten (Spuren 1-6), konnte aus jedem Extrakt etwa gleich viel RNA-Polymerase I präzipitiert werden (Spuren 7-10). Erwartungsgemäß wurden im Wildtyp infolge der Aminosäuredepletion sowohl die Rrn3p-Prot.A-Gesamtmenge (Spuren 1 und 2) als auch die Menge des Pol I-assoziierten Proteins stark herunterreguliert (Spuren 7 und 8). Eine Quantifizierung ergab, dass die wachstumsinhibierten WT-Hefen noch 35 % der ursprünglich vorhandenen Pol I-Rrn3p-Komplexe enthielten. Im Rrn3-ΔN-Stamm, in dem wiederum keine Rrn3p-Degradation stattfand (Spuren 3 und 4), verringerte sich die Komplexmenge zwar ebenfalls, doch gingen hier deutlich weniger Komplexe verloren als im Wildtyp (Rückgang auf 64 %, Spuren 9 und 10).

Um die RNA-Polymerase I aus Extrakten der Proteasom-ts-Mutante cim3-1 präzipitieren zu können, wurde ein Stamm verwendet, der ein A43-TAP-Fusionsprotein sowie ein HA₃-getagtes Rrn3p exprimiert. Wachsende Zellen dieses Stammes und des entsprechenden Wildtyps wurden von YPD- in SDC-Leu-Medium transferiert und gleichzeitig für die Dauer von zwei Stunden auf die restriktive Temperatur gebracht. Der Stamm cim3-1-Rrn3-HA₃ fungierte als Hintergrund-Kontrolle (zur Herstellung der Stämme siehe Kap. 4.5.14.1). Dann wurden mittels Hochsalzaufschluss Gesamtzellextrakte hergestellt. Zur Anreicherung des A43-TAP-Fusionsproteins wurde IgG-Sepharose verwendet. Da der Pol I-Rrn3p-Komplex sehr stabil ist, konnten die Co-IPs unter ähnlich stringenten Bedingungen (400 mM Ammoniumsulfat, 750 mM Kaliumacetat, 0,5 % NP40, 0,05 % Triton X-100) durchgeführt werden, wie sie bei der in Kap. 2.4 beschriebenen Präzipitation des Rrn3p aus wachsenden und stationären Hefen angewandt wurden (vgl. Fath et al., 2001). Die Gesamtzellextrakte (Inputs) und die Präzipitate (Prot.A-IPs) wurden in den in Abb. 2.17 B dargestellten Western-Blots analysiert.

In der inaktivierten Proteasom-ts-Mutante wurde das HA₃-getagte Rrn3p teilweise abgebaut (Spuren 3 und 4). Die Proteinmenge reduzierte sich jedoch weniger deutlich als im Wildtyp, der zwei Stunden nach Austausch des Mediums keine detektierbaren Rrn3p-HA₃-Mengen mehr enthielt (Spuren 1 und 2). Dementsprechend wurde im Extrakt der wachstumsarretierten WT-Hefen auch kein Pol I-assoziiertes Rrn3p nachgewiesen (Spur 7), wohingegen aus dem entsprechenden cim3-1-Extrakt eine größere Menge an Pol I-Rrn3p-Komplexen isoliert werden konnte (Spur 9). Während die Rrn3p-Gesamtmenge in der inaktivierten Mutante auf 64 % der Ausgangsmenge zurückging, reduzierte sich die Komplexmenge auf 37 %.

Somit scheinen wachstumsinhibierte Hefen grundsätzlich weniger Pol I-Rrn3p-Komplexe auszubilden als wachsende Zellen, wobei sich die Komplexmenge allerdings weniger deutlich verringert, wenn die Komplexkomponente Rrn3p nicht abgebaut wird. Folglich ist der in wachstumsarretierten *S. cerevisiae*-Zellen stattfindende Verlust an initiationskompetenten Pol I-Rrn3p-Komplexen zu einem großen Teil auf die Degradation des Rrn3p zurückzuführen. Da allerdings in den hier untersuchten Mutanten die Menge des Pol I-assoziierten Rrn3p immer stärker

zurückging als die Rrn3p-Gesamtmenge, trägt höchstwahrscheinlich noch ein anderer Mechanismus zur verminderten Komplexbildung in wachstumsinhibierten Hefen bei.

Nachdem gezeigt werden konnte, wie sich die in wachstumsarretierten Hefen beobachtete Rrn3p-Degradation auf die Pol I-Rrn3p-Interaktion auswirkt, sollte mit Hilfe des Tetracyclin-regulierbaren Stammes pTet₇-Rrn3-Prot.A untersucht werden, ob künstlich veränderte Rrn3p-Mengen die Komplexbildung ebenfalls beeinflussen. Da in diesem Stamm keine der Polymerase-Untereinheiten über einen Affinitätstag verfügt, musste der Komplex über den Protein A-Anteil des Rrn3p-Fusionsproteins angereichert werden. Zur Durchführung des Experiments wurden zwei früh-logarithmische pTet₇-Kulturen für die Dauer von 18 Stunden mit 0,01 und 0,2 µg/ml Doxycyclin versetzt. Diese sollten mit wachsenden und rapamycinbehandelten Zellen des Stammes BSY420-Rrn3-Prot.A verglichen werden. Als Hintergrund-Kontrolle kamen wachsende BSY420-Zellen zum Einsatz. Gleiche Mengen der mittels Hochsalzaufschluss hergestellten Gesamtzellextrakte wurden mit IgG-Sepharose inkubiert, um das darin enthaltene Rrn3p-Prot.A anzureichern. Zur Minimierung unspezifischer Protein-Wechselwirkungen mit der Affinitätsmatrix wurden die Co-IPs wiederum unter stringenten Bedingungen durchgeführt.

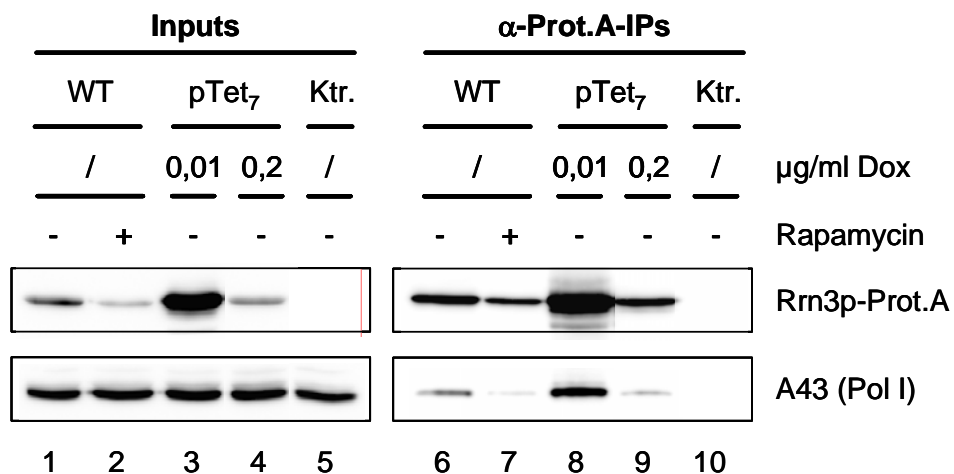


Abb. 2.18: Anreicherung des Pol I-Rrn3p-Komplexes aus Gesamtzellextrakten des Doxycyclin-regulierbaren Stammes pTet₇-Rrn3-Prot.A.

pTet₇-Rrn3-Prot.A-Hefen, die 18 h lang in Gegenwart von 0,01 und 0,2 µg/ml Doxycyclin kultiviert worden waren, wurden ebenso wie wachsende und 2 h mit 200 ng/ml Rapamycin behandelte BSY420-Rrn3-Prot.A-Zellen (WT) und eine logarithmische BSY420-Kultur (Ktr.) in einem Hochsalzpuffer aufgeschlossen. Zur Anreicherung des Prot.A-getagten Rrn3p wurden anschließend jeweils 6 mg WCE unter stringenten Bedingungen (400 mM Ammoniumsulfat, 750 mM Kaliumacetat, 0,5 % NP40, 0,05 % Triton X-100) mit IgG-Sepharose inkubiert. Nach mehreren ebenfalls stringenten Waschschritten mit 5 mM NH₄Ac (pH 5,0) und 1,5 M Kaliumacetat/0,5 % NP40 wurden die Präzipitate zusammen mit 0,5 % der Inputs in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Für die Immunfärbung wurden den Prot.A-Tag des Rrn3p ererkennende PAP-Immunkomplexe verwendet, während die kopräzipitierte RNA-Polymerase I mit Hilfe eines polyklonalen α-A43-Antikörpers nachgewiesen wurde.

Wie auf den Western-Blots in Abb. 2.18 zu erkennen ist, wiesen die verschiedenen Gesamtzellextrakte (Inputs) höchst unterschiedliche Rrn3p-Prot.A-Mengen auf. Während die mit

0,01 µg/ml Dox behandelten pTet₇-Zellen (Spur 3) deutlich mehr Fusionsprotein exprimierten als die wachsenden WT-Hefen (Spur 1), enthielten die zweite pTet₇-Kultur (0,2 µg/ml Dox, Spur 4) und die wachstumsinhibierten WT-Zellen (Spur 2) wesentlich geringere, annähernd gleiche Rrn3p-Mengen. Die in den Gesamtzellextrakten vorliegenden Verhältnisse spiegeln sich in den rechts davon abgebildeten Co-IPs wider (Spuren 6-10). Während in den zuvor beschriebenen Experimenten vergleichbare Mengen RNA-Polymerase I präzipitiert wurden, war es hier nicht möglich, gleiche Mengen Rrn3p anzureichern. Folglich können auch die jeweils kopräzipitierten A43-Mengen nicht direkt miteinander verglichen werden. Trotzdem erkennt man aber, dass die verschiedenen Lysate in Abhängigkeit von der jeweiligen Rrn3p-Gesamtmenge unterschiedlich viel Pol I-Rrn3p-Komplex enthielten.

Somit ließen auch die mit dem TetO-Promotor-Stamm durchgeführten Co-IPs den Schluss zu, dass in *S. cerevisiae* die in den Zellen vorliegende Rrn3p-Proteinmenge die Bildung des Pol I-Rrn3p-Komplexes beeinflusst. Sobald Rrn3p überexprimiert wird, bilden sich mehr Komplexe aus. Umgekehrt wird die Komplexmenge reduziert, wenn weniger Protein vorhanden ist.

2.6 Lokalisierung des Rrn3p in wachsenden und wachstumsarretierten Hefezellen

Wie in Kap. 2.5 demonstriert werden konnte, ist der Abbau des Rrn3p mit dafür verantwortlich, dass wachstumsarretierte *S. cerevisiae*-Zellen geringere Mengen Pol I-Rrn3p-Komplex aufweisen als wachsende Hefen. Im Säugersystem scheint die Komplexmenge hingegen weniger durch proteolytische Ereignisse als vielmehr über Relokalisationsvorgänge reguliert zu werden. Denn Mayer und Kollegen konnten zeigen, dass die in rapamycin-behandelten HeLa-Zellen stattfindende Dissoziation des Pol I-Rrn3/TIF-IA-Komplexes durch eine TIF-IA-Translokation vom Zellkern ins Zytoplasma verursacht wird (Mayer et al., 2004). Für das Hefesystem lagen bis zum jetzigen Zeitpunkt keine vergleichbaren Daten vor. Daher sollte in der vorliegenden Doktorarbeit untersucht werden, ob in wachstumsinhibierten Hefezellen neben der Rrn3p-Degradation eine Umverteilung des Faktors zum Verlust der initiationskompetenten Pol I-Rrn3p-Komplexe beiträgt.

Zu diesem Zweck wurden wachsende und aminosäuredepletierte Zellen des Stammes BSY420-Rrn3-TAP sphäroplastierte, sodass eine Immunfärbung mit einem gegen den TAP-Tag gerichteten Primär- sowie einem Alexa 594-gelabelten Sekundär-Antikörper durchgeführt werden konnte. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Sphäroplasten zeigte sich in Übereinstimmung mit einer systematischen Lokalisationsstudie (Huh et al., 2003; <http://yeastgfp.ucsf.edu>), dass sich in wachsenden Hefen der größte Teil des Rrn3p im Nukleolus befindet. Das restliche Protein konnte im Nukleoplasma detektiert werden (siehe Abb. 2.19, obere Reihe). Zudem bestätigte sich, dass der Faktor bei einem Wachstumsarrest abgebaut wird, denn die Sphäroplasten der wachstumsinhibierten Hefen wiesen eine deutlich schwächere Fluoreszenz auf

als die der wachsenden Zellen. Wegen der schwachen Signalintensität konnte allerdings keine eindeutige Aussage über die subzelluläre Verteilung des Faktors gemacht werden (Abb. 2.19, untere Reihe).

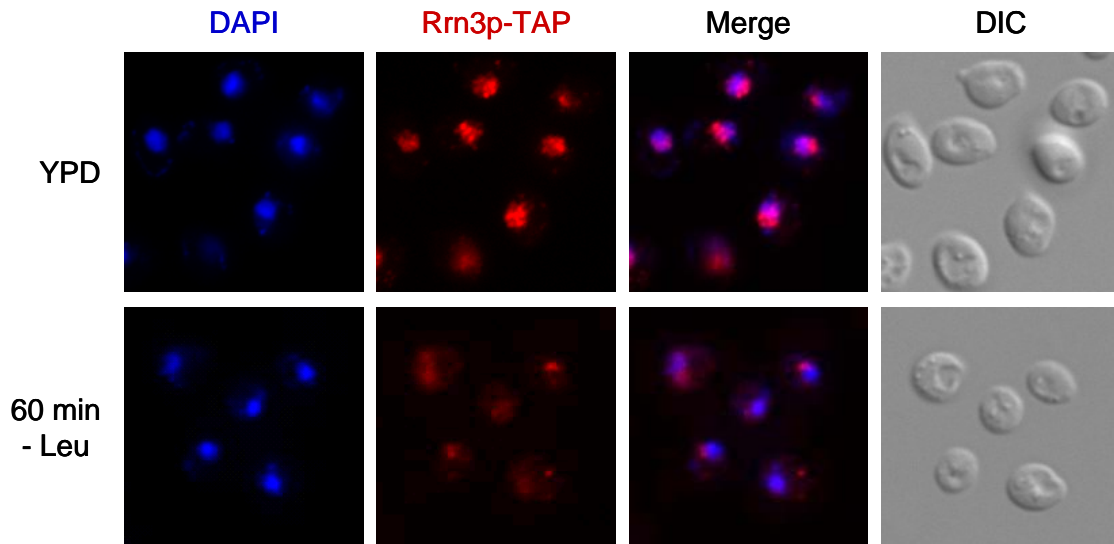


Abb. 2.19: Subzelluläre Verteilung des Rrn3p in wachsenden und aminosäuredepletierten WT-Hefen.

Wachsende und aminosäuredepletierte Zellen des Stammes BSY420-Rrn3-TAP wurden fixiert und sphäroplastierte, sodass eine Immunfärbung mit einem gegen den TAP-Tag des Rrn3p gerichteten α -Protein A-Primär-Antikörper und einem Alexa 594-gelabelten Sekundär-Antikörper durchgeführt werden konnte. Zusätzlich wurde mit einer DAPI-Färbung die Kern-DNA nachgewiesen. Zur Visualisierung der Immunkomplexe wurden ein Axiovert 200M-Fluoreszenzmikroskop von Zeiss verwendet (Vergrößerung: 63-fach x Okular). Merge: Überlagerung der Einzelbilder, DIC: Phasenkontrastbild.

Um eine möglicherweise stattfindende Umverteilung des Rrn3p dennoch nachweisen zu können, wurde auf die beiden Mutanten zurückgegriffen, in denen das Protein bei einem Wachstumsarrest nicht degradiert wird. Zunächst wurden die entsprechenden Sphäroplasten des Stammes pNOP1-Rrn3- Δ N-Prot.A mit denjenigen des isogenen WT-Stammes verglichen (Abb. 2.20). Während die Rrn3p-Fluoreszenz im Wildtyp nach Durchführung der Aminosäuredepletion wie erwartet abnahm (Reihe 1 und 2), blieb die Signalintensität in der Deletionsmutante unverändert (Reihe 3 und 4). Auch hinsichtlich der nukleolär-nukleären Lokalisation des Faktors konnten keine Unterschiede zwischen wachsenden und wachstumsinhibierten Rrn3- Δ N-Zellen festgestellt werden.

Zur Überprüfung der Mikroskopie-Daten wurde anschließend eine biochemische Fraktionierung durchgeführt. WT- und Rrn3- Δ N-Hefen, die einer einstündigen Aminosäuredepletion unterzogen worden waren, wurden zusammen mit wachsenden Zellen der beiden Stämme sphäroplastierte. Anschließend wurden die Zellkerne vom Zytoplasma getrennt, sodass beide Fraktionen unabhängig voneinander in einem Western-Blot analysiert werden konnten. Neben den zwei Rrn3p-Versionen wurden dabei das nukleoläre Protein Nop1p sowie die im Zytoplasma vorkommende

Phosphoglyceratkinase (PGK) nachgewiesen, um die Qualität der Fraktionierung einschätzen zu können.

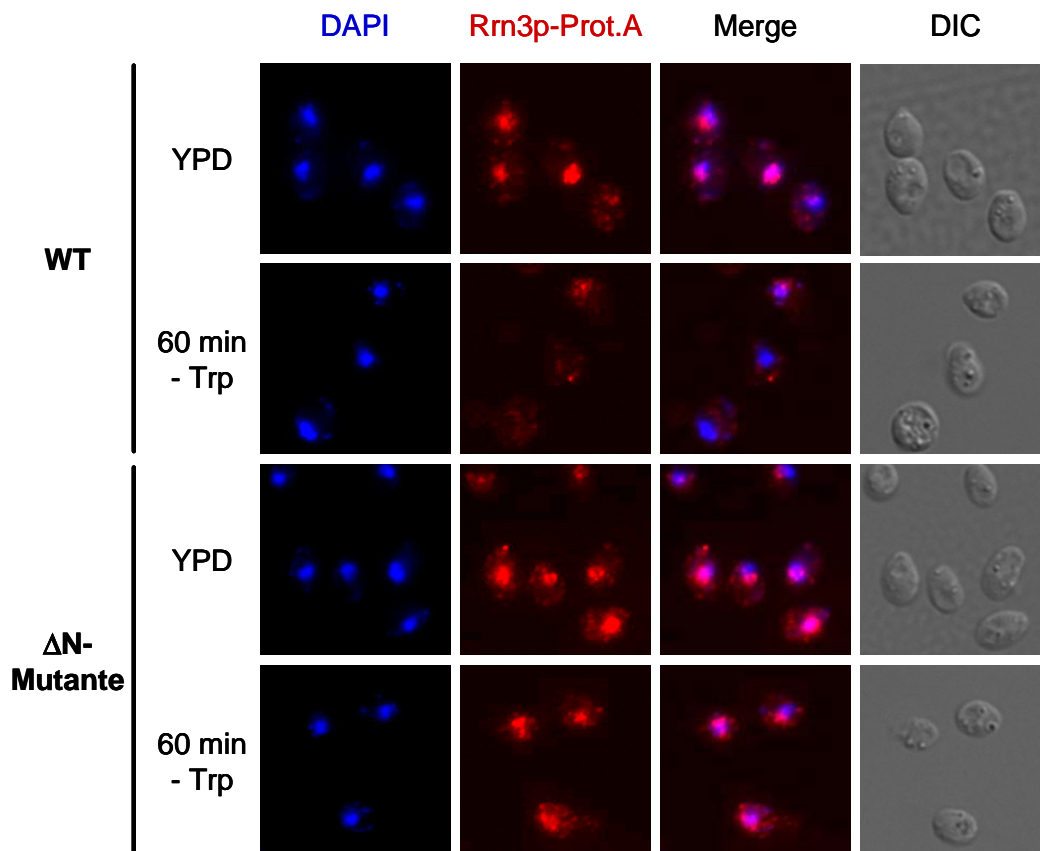


Abb. 2.20: Rrn3p-Lokalisation in wachsenden und aminosäuredepletierten Zellen der Rrn3- Δ N-Mutante. Wachsende und aminosäuredepletierte Zellen der Stämme pNOP1-Rrn3-Prot.A (WT) und pNOP1-Rrn3- Δ N-Prot.A (Δ N-Mutante) wurden zunächst fixiert und sphäroplastierte, bevor die beiden Rrn3p-Versionen mit einem α -Protein A-Primär-Antikörper und einem Alexa 594-konjugierten Sekundär-Antikörper immungefärbt wurden. Die Kerne wurden mit DAPI detektiert. Mit Hilfe eines Axiovert 200M-Fluoreszenzmikroskops von Zeiss wurden die Immunkomplexe sichtbar gemacht (Vergrößerung: 63-fach x Okular). Merge: Überlagerung der Einzelbilder, DIC: Phasenkontrastbild.

Wie auf den Western-Blots in Abb. 2.21 zu erkennen ist, gelang es relativ gut, die Zellkerne vom Zytoplasma abzutrennen. Das in wachsenden WT-Hefen exprimierte Rrn3p-Prot.A wurde in Übereinstimmung mit den Mikroskopie-Daten größtenteils in der Kernfraktion detektiert (oberer Teil, Spur 3). Auch in den wachstumsarretierten WT-Zellen lag der Faktor überwiegend in den Kernen vor, wenn auch wie erwartet in geringerer Menge (oberer Teil, Spur 4). Ebenso wurde die in der Deletionsmutante exprimierte verkürzte Rrn3p-Version hauptsächlich in der Kernfraktion nachgewiesen, wobei hinsichtlich der Signalstärke und dem Verteilungsmuster zwischen wachsenden und wachstumsinhibierten Zellen wiederum kein gravierender Unterschied festgestellt werden konnte (unterer Teil der Abbildung, Spuren 3 und 4). Somit lieferte auch der biochemische Ansatz keinerlei Hinweise auf eine wachstumsabhängige Umverteilung des Hefe-Rrn3p.

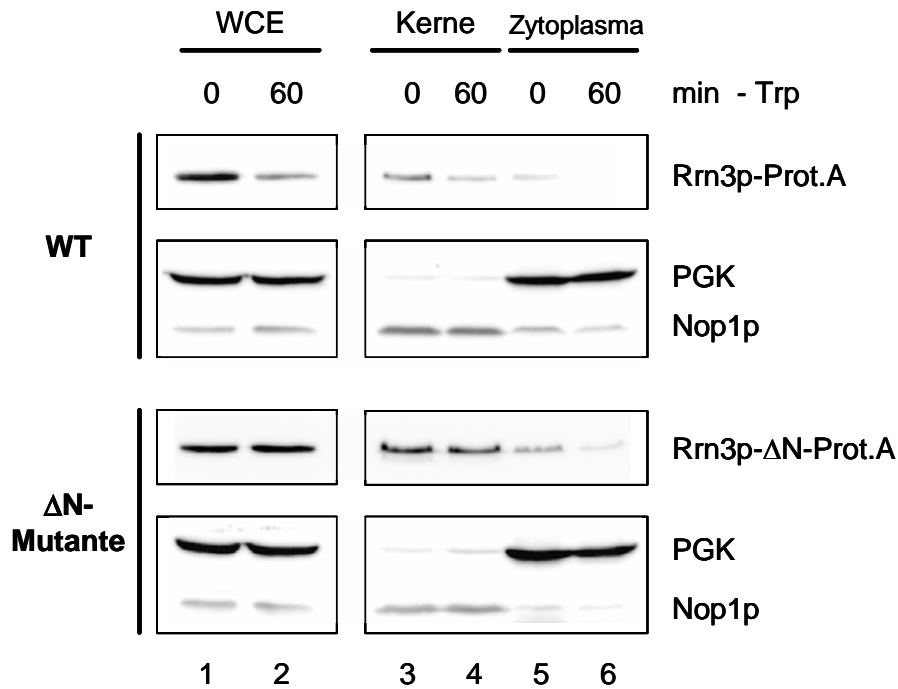


Abb. 2.21: Kern-Zytoplasma-Fraktionierung mit der Rrn3-ΔN-Mutante und dem isogenen WT-Stamm. Nachdem wachsende YPD-Kulturen der Stämme pNOP1-Rrn3-Prot.A (WT) und pNOP1-Rrn3-ΔN-Prot.A (ΔN-Mutante) eine OD₆₀₀ von ca. 0,8 erreicht hatten (Zeitpunkt: 0 min), wurde ein Teil der Zellen in SDC-Trp-Medium überführt. 1 h später wurden die Hefen sphäroplastierte und mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators aufgeschlossen. Mittels Zentrifugation wurden anschließend die Zellkerne vom Zytoplasma getrennt, sodass beide Fraktionen unabhängig voneinander in einem Western-Blot analysiert werden konnten. Dazu wurden jeweils 5 % der Kern- und 5 % der Zytoplasma-Fractionen sowie die entsprechenden WCEs (jeweils 30 μg) in 10 %igen SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert, welche zum Nachweis der Rrn3p-Versionen zunächst mit PAP-Immunkomplexen inkubiert wurden. Um die Qualität der Fraktionierung beurteilen zu können, wurden außerdem das zytoplasmatische Protein Phosphoglyceratkinase (PGK) und der nukleoläre Marker Nop1p sichtbar gemacht.

Um ausschließen zu können, dass die N-terminale Deletion für den beobachteten Phänotyp verantwortlich ist, wurden die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen auf die Proteasom-ts-Mutante ausgeweitet. Der hier analysierte Stamm cim3-1-Rrn3-TAP-A43-HA₃ zeichnete sich sowohl bei der permissiven als auch bei der restriktiven Temperatur durch vergrößerte Zellen aus und wies gegenüber dem isogenen WT-Stamm ein wesentlich stärkeres nukleolär-nukleäres Rrn3p-Signal auf (Abb. 2.22, Reihen 3 und 4). Allerdings konnte auch in diesem Stamm keine Rrn3p-Relokalisation festgestellt werden, als die Zellen einer Leucindepletion unterzogen und gleichzeitig auf die restriktive Temperatur gebracht wurden.

Auch hier kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Umverteilung des Faktors aufgrund der Inaktivierung des Proteasoms verhindert wird. Dennoch kann in Anbetracht aller in diesem Kapitel präsentierten Daten wohl behauptet werden, dass in *S. cerevisiae* keine wachstumsabhängige Relokalisation des Rrn3p stattfindet. Höchstwahrscheinlich behält das Hefeprotein auch unter ungünstigen Wachstumsbedingungen seine nukleolär-nukleäre Verteilung bei.

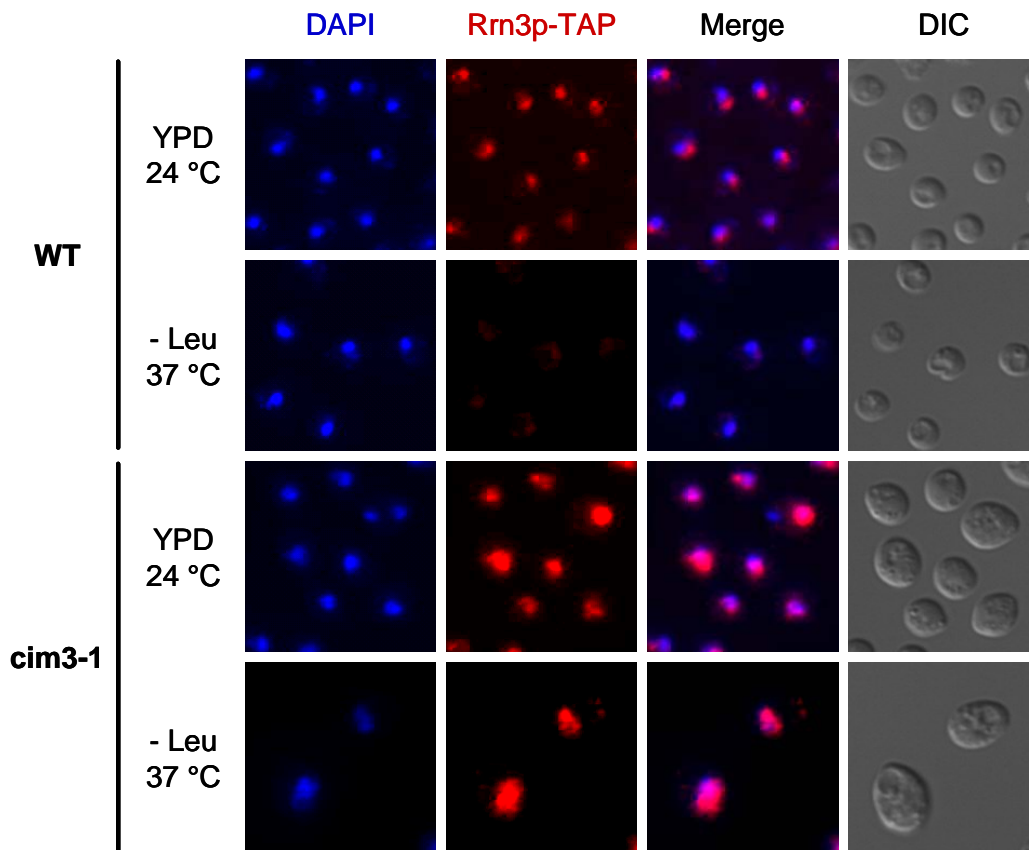


Abb. 2.22: Rrn3p-Lokalisation in wachsenden und inaktivierten Zellen der Proteasom-ts-Mutante *cim3-1*. Nachdem bei 24 °C wachsende YPD-Kulturen der Stämme YWO365-Rrn3-TAP-A43-HA₃ (WT) und *cim3-1*-Rrn3-TAP-A43-HA₃ in SDC-Leu-Medium überführt und gleichzeitig für die Dauer von 2 h auf die restriktive Temperatur gebracht worden waren, wurden die Zellen fixiert und sphäroplastierte. Anschließend wurde eine Immunfärbung mit einem gegen den TAP-Tag des Rrn3p gerichteten α -Protein A-Primär-Antikörper und einem Alexa 594-konjugierten Sekundär-Antikörper durchgeführt. Der Nachweis der Kern-DNA erfolgte mit DAPI. Zur Visualisierung der Immunkomplexe wurde ein Axiovert 200M-Fluoreszenzmikroskop von Zeiss verwendet (Vergrößerung: 63-fach x Okular). Merge: Überlagerung der Einzelbilder, DIC: Phasenkontrastbild.

2.7 Untersuchung der rDNA-Okkupanzen des Rrn3p, der RNA-Polymerase I und des Core-Faktors in wachsenden und wachstumsinhibierten Zellen der Rrn3- Δ N-Mutante

Nachdem gezeigt werden konnte, dass in wachstumsinhibierten Zellen der Rrn3- Δ N-Mutante kein Rrn3p-Abbau stattfindet und deshalb weniger RNA-Polymerase I-Rrn3p-Komplexe verloren gehen als in den entsprechenden WT-Zellen, sollte anschließend untersucht werden, ob aufgrund dessen in der Mutante bei einem Wachstumsarrest mehr rDNA-assoziierte Pol I vorhanden ist als im Wildtyp.

Die Interaktion zwischen der RNA-Polymerase I und der rDNA wurden in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Chromatin-Immunpräzipitationen charakterisiert. Bei dieser auch als ChIP-Assay bezeichneten Methode behandelt man die zu untersuchenden Hefezellen zunächst mit Formaldehyd, welches die Chromatinkomponenten (chromosomale DNA und assoziierte Proteine) miteinander

vernetzt. Die anschließend hergestellten Zellextrakte werden einer Ultraschallbehandlung ausgesetzt, sodass relativ kleine DNA-Fragmente entstehen. Dann werden aus den Lysaten ein bestimmtes Protein und die damit assoziierten DNA-Fragmente immunpräzipitiert. Nach Aufhebung des Crosslinks werden die Präzipitate einem Proteinase K-Verdau unterzogen, sodass die angereicherten DNA-Fragmente extrahiert und als Template in einer PCR-Analyse eingesetzt werden können. Werden dabei unter Verwendung sequenzspezifischer Primer bestimmte DNA-Bereiche stärker amplifiziert als andere genomische Regionen (= interne Kontrollen), kann daraus geschlossen werden, dass das präzipitierte Protein mit diesen Bereichen in vivo direkt oder indirekt interagiert. Zudem kann die Interaktion des Proteins mit den einzelnen DNA-Sequenzen quantitativ erfasst werden.

Um die RNA-Polymerase I aus Chromatinextrakten der Rrn3-ΔN-Mutante und des isogenen Wildtyps präzipitieren zu können, wurde in den beiden Stämmen pNOP1-Rrn3-ΔN-Prot.A und pNOP1-Rrn3-Prot.A ein dreifacher HA-Tag an das 3'-Ende des RPA43-Gens fusioniert. Außerdem wurden Stämme hergestellt, die neben den Rrn3p-Prot.A-Versionen eine HA₃-getagte UAF- bzw. CF-Komponente (Rrn5p-HA₃ bzw. Rrn6p-HA₃) exprimieren. Auf diese Weise konnten alle Bestandteile des Pol I-Präinitiationskomplexes in die Analysen miteinbezogen werden (zur Herstellung der Stämme siehe Kap. 4.5.14.1). Die neu konstruierten WT- und ΔN-Stämme wurden wie gehabt bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase in Vollmedium kultiviert, bevor ein Teil der Zellen für die Dauer von zwei Stunden in SDC-Trp-Medium überführt und anschließend alle Kulturen mit Formaldehyd gecrosslinkt wurden. Die Chromatin-IPs wurden nach einem von Hecht und Grunstein (1999) entwickelten Protokoll durchgeführt, das aufgrund stringenter IP- und Waschbedingungen eine sehr spezifische Proteinanreicherung gewährleistet. Zur Präzipitation der HA-Fusionsproteine wurden ein monoklonaler α-HA-Antikörper und Protein G-Sepharose verwendet, wohingegen die Prot.A-getagten Rrn3p-Versionen mit IgG-Sepharose angereichert wurden. Die Analyse der mit den jeweiligen Zielproteinen assoziierten rDNA-Fragmente erfolgte mittels quantitativer PCR (qPCR). In Abb. 2.23 sind die drei Regionen im Bereich des rRNA-Gen-Promotors (P), der 25S-rDNA (25S) und der 5S-rDNA (5S) angegeben, die dabei unabhängig voneinander amplifiziert wurden. Bei der Auswertung der PCR-Daten wurden die IP- zunächst gegen die Input-Werte abgeglichen, bevor alle normalisierten IP-Werte eines Stammes auf die Promotor-IP der wachsenden Zellen bezogen wurden. Das nicht von der RNA-Polymerase I transkribierte 5S-rRNA-Gen diente bei allen Experimenten als interne Kontrolle.

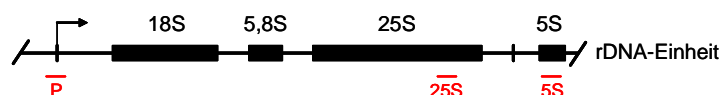


Abb. 2.23: Position der qPCR-Amplikons auf der rDNA zur Auswertung der in dieser Arbeit durchgeführten Rrn3p-, A43 (Pol I)-, und Rrn6p (CF)-ChIPs.

P: rRNA-Gen-Promotor (-42 bis +70; Primer: Prom ChIP-F2 und Prom ChIP-R1), 25S: rRNA-Gen im 25S-rRNA kodierenden Bereich (+6367 bis +6434; Primer: M1 und M2), 5S: 5S-rRNA-Gen (+7 bis +119; Primer: 5S ChIP-F1 und 5S ChIP-R1).

Mehrere Gruppen hatten mit Hilfe von ChIP-Experimenten festgestellt, dass in wachstumsinhibierten WT-Hefen die RNA-Polymerase I nicht vollständig von der rDNA abdissoziiert. Bei Claypool und Kollegen waren nach einer einstündigen Rapamycinbehandlung noch 35 % der Pol I-Moleküle mit den rDNA-Promotoren und der 25S-rDNA assoziiert. Für das mit den Promotoren interagierende Rrn3p wurde mit 30 % ein ähnlicher Wert gemessen, wohingegen die Menge des Promotor-assoziierten Upstream-Activating-Faktors (UAF) unverändert blieb (Claypool et al., 2004). Auch bei Laferté et al. (2006) ging die Pol I-rDNA-Interaktion nach einer 20-minütigen Rapamycinbehandlung nicht vollständig verloren, sondern reduzierte sich lediglich um 60 %. Die in dieser Arbeit durchgeführten Chromatin-IPs dienten zum einen der Überprüfung dieser interessanten Ergebnisse und sollten darüber hinaus mögliche Auswirkungen des wachstumsabhängigen Rrn3p-Abbaus auf die Pol I-Rekrutierung an die rDNA dokumentieren.

Zur Etablierung des ChIP-Assays wurde zunächst die UAF-Komponente Rrn5p präzipitiert. Wie erwartet wurde der Faktor lediglich in der Promotorregion gefunden, wobei wachsende und wachstumsarretierte WT-Hefen in Übereinstimmung mit den Claypool-Daten etwa gleich viel Promotor-assoziierten UAF aufwiesen. Die Rrn3-ΔN-Mutante lieferte ein ähnliches Ergebnis. (Keine Abbildung, da das Experiment nicht wiederholt wurde.)

Anschließend wurden die beiden Rrn3p-Prot.A-Versionen einer ChIP-Analyse unterzogen. Wie in der linken Hälfte von Abb. 2.24 A zu erkennen ist, verringerte sich in den wachstumsarretierten WT-Hefen die Menge des Promotor-gebundenen Proteins auf 40 % des Ausgangswertes. Dieser Wert weicht nur geringfügig von den 30 % ab, die Claypool et al. bei ihren ChIP-Experimenten ermittelt hatten. Auf der rechten Seite der Abbildung sind die mit der Rrn3-ΔN-Mutante durchgeführten Chromatin-IPs zusammengefasst. Ebenso wie die WT-Form wurde auch das trunkierte Protein lediglich im Promotorbereich nachgewiesen. Folglich dissoziiert die mutierte Version genau wie das WT-Rrn3p von der Polymerase ab, sobald diese den Promotor verlässt. Nach der Aminosäuredepletion ging die Menge des Promotor-gebundenen Rrn3p-ΔN-Prot.A auf etwas mehr als 50 % des Ausgangswertes zurück.

Abb. 2.24 B zeigt die RNA-Polymerase I-ChIPs. Erwartungsgemäß wurde das Enzym nicht nur am rRNA-Gen-Promotor sondern auch im Bereich der 25S-rRNA kodierenden Region gefunden. Wie bei Claypool et al. reduzierte sich in den wachstumsinhibierten WT-Hefen die Menge der rDNA-gebundenen Pol I auf 30-40 % des Ausgangswertes. In den aminosäuredepletierten Zellen der Rrn3-ΔN-Mutante waren dagegen noch 50-60 % der Polymerase-Moleküle mit den Promotoren und den rRNA-Genen assoziiert.

ChIP-Experimente, bei denen die CF-Untereinheit Rrn6p angereichert wurde, ließen keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der Rrn3-Deletionsmutante erkennen. In beiden Stämmen verringerte sich die Promotor-Okkupanz des Core-Faktors nach der Aminosäuredepletion um ca. 20 % (Abb. 2.24 C).

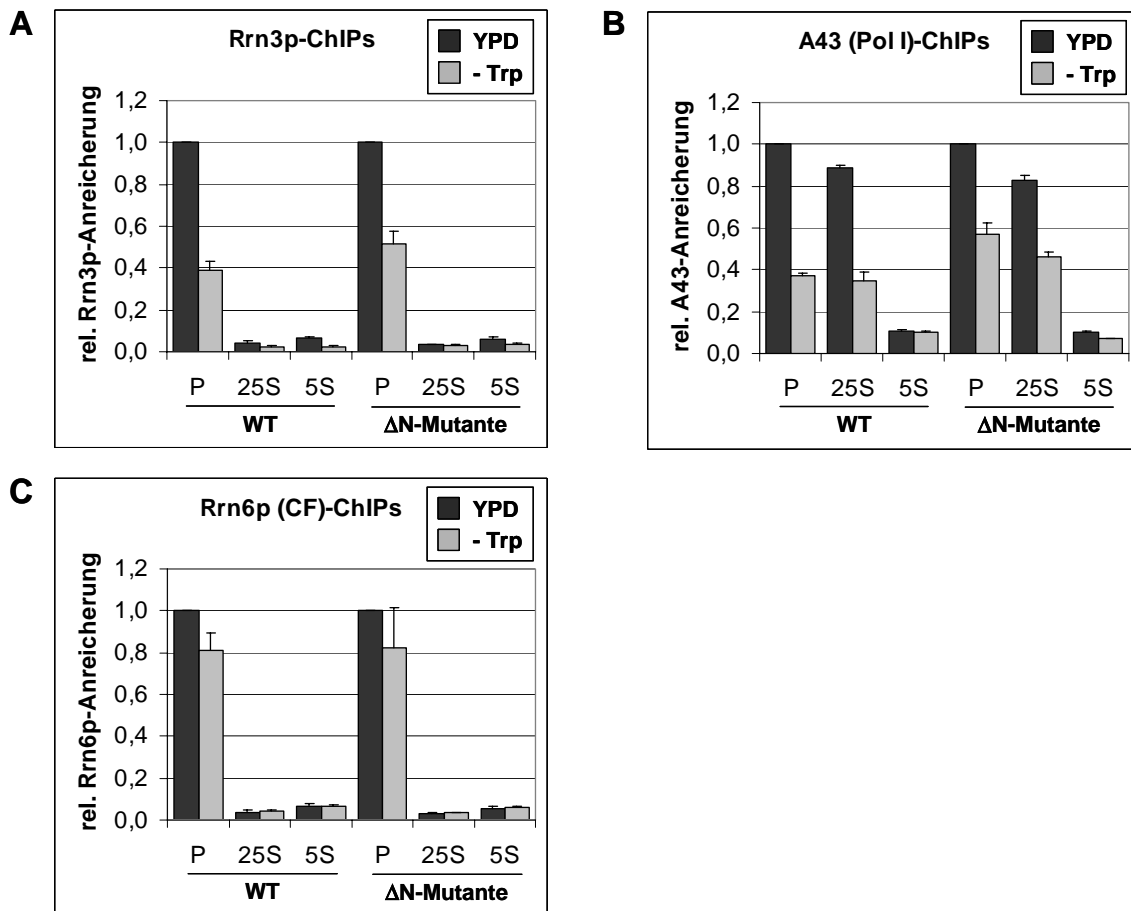


Abb. 2.24: Chromatin-IPs (ChIPs) zur Bestimmung der rDNA-Okkupanz der RNA-Polymerase I, des Rrn3p und des Core-Faktors in wachsenden und wachstumsinhibierten Zellen der Rrn3-ΔN-Mutante und des isogenen Wildtyps. Wachsende (YPD) und wachstumsarretierte (120 min SDC-Trp) 50 ml-Kulturen der Stämme (A) pNOP1-Rrn3-Prot.A (WT), pNOP1-Rrn3-ΔN-Prot.A (ΔN-Mutante), (B) pNOP1-Rrn3-Prot.A-A43-HA₃ (WT), pNOP1-Rrn3-ΔN-Prot.A-A43-HA₃ (ΔN-Mutante), (C) pNOP1-Rrn3-Prot.A-Rrn6-HA₃ (WT) und pNOP1-Rrn3-ΔN-Prot.A-Rrn6-HA₃ (ΔN-Mutante) wurden zunächst mit 1 % Formaldehyd gecrosslinkt, bevor die Zellen aufgeschlossen und sonifiziert wurden. Zur Anreicherung der Prot.A-getagten Rrn3p-Versionen und der HA₃-getagten Proteine A43 und Rrn6p wurden die Extrakte mit IgG-Sepharose bzw. einem Protein G-Sepharose-gekoppelten α-HA-Antikörper (3F10) inkubiert. Nach Aufhebung des Crosslinks wurde aus den Präzipitaten (IPs) und den jeweiligen Inputs (8 % der in den IPs eingesetzten Extrakte) die DNA extrahiert. 1:2000-Verdünnungen der Input-DNA sowie 1:400-Verdünnungen der IP-DNA wurden anschließend als Templates für eine qPCR-Analyse verwendet. Dabei wurden unabhängig voneinander ein rRNA-Gen-Promotor- (P) und ein rRNA-Gen-Bereich (25S) sowie als interne Kontrolle das 5S-rRNA-Gen (5S) amplifiziert (zur genauen Position der Amplikons siehe Abb. 2.23). Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardabweichungen von Dreifach-PCR-Messungen aus drei unabhängigen Experimenten dar. Die IP-Werte wurden gegen die jeweiligen Input-Werte abgeglichen, anschließend wurden alle normalisierten IP-Werte eines Stammes in Relation zur Promotor-IP der wachsenden Zellen gesetzt.

Aufgrund der in Abb. 2.17 A ausgewerteten Co-IPs ist anzunehmen, dass die RNA-Polymerase I-Rrn3p-Interaktion in wachstumsarretierten WT-Hefen nicht vollständig verloren geht. Der in dieser Arbeit analysierte Stamm pNOP1-Rrn3-Prot.A-A43-HA₃ enthielt zwei Stunden nach Durchführung einer Aminosäuredepletion noch 35 % der ursprünglich nachgewiesenen Pol I-Rrn3p-Komplexe. Den in diesem Kapitel gezeigten ChIP-Analysen zufolge wurden die noch vorhandenen Komplexe an die rDNA-Promotoren rekrutiert. Außerdem wurde in den wachstumsinhibierten WT-Zellen eine entsprechende Menge an rRNA-Gen-assoziierten Pol I-Molekülen gefunden. In der Rrn3-ΔN-

Mutante, in der die Komplexmenge weniger stark abnahm als im Wildtyp (Reduktion auf 64 % der Ausgangsmenge), ging dementsprechend auch die rDNA-Interaktion des Enzyms auf nur ca. 60 % zurück. Demnach scheint die rDNA-Okkupanz der RNA-Polymerase I in wachstumsarretierten Hefen von der in den Zellen vorliegenden Menge an Pol I-Rrn3p-Komplexen abzuhängen, was wiederum bedeutet, dass aufgrund der Rrn3p-Degradation, die zum Komplexverlust beiträgt, auch weniger Pol I-Moleküle an die rDNA rekrutiert werden.

2.8 Einfluss des Rrn3p-Abbaus auf die RNA-Polymerase I-Transkription

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass die Rrn3- Δ N-Mutante im wachstumsinhibierten Zustand über eine größere Menge RNA-Polymerase I-Rrn3p-Komplexe und aufgrund dessen über mehr rDNA-assoziiertes Enzym verfügt als die entsprechenden WT-Hefen, sollte abschließend der Frage nachgegangen werden, ob sich diese Unterschiede auch auf die rRNA-Neusynthese auswirken.

Die Syntheseleistung der RNA-Polymerase I wird häufig mit Hilfe von In-vivo-Pulse-Labelings analysiert. Bei einer Variante dieses Verfahrens werden die zu untersuchenden Hefezellen für eine bestimmte Zeit in Gegenwart von ^3H -gelabeltem Uracil kultiviert (gepulst), welches dabei in alle neusynthetisierten RNA-Spezies eingebaut wird. Anschließend wird die Gesamt-RNA aus den Zellen extrahiert, in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Nach dem Transfer können dann sowohl das neusynthetisierte, ^3H -markierte Primärtranskript der Pol I, die 35S-prä-rRNA, als auch einige ihrer Prozessierungsprodukte autoradiographisch sichtbar gemacht werden. Powers und Walter hatten mit Hilfe eines [C^3H_3]-Methionin-Pulse-Assays demonstriert, dass mit Rapamycin behandelte WT-Hefen zunächst die rRNA-Prozessierung einstellen. Längerfristig verschwindet dann auch die 35S-rRNA, was allgemein als wachstumsabhängige Inhibition der RNA-Polymerase I-Transkription gedeutet wird (Powers und Walter, 1999).

Da ein Mediumswechsel die Labeling-Bedingungen verändern würde, wurden in der vorliegenden Arbeit keine aminosäuredepletierten, sondern ebenfalls rapamycinbehandelte Hefen für die Pulse verwendet. In Vollmedium wachsende Zellen der Stämme pNOP1-Rrn3-Prot.A (WT) und pNOP1-Rrn3- Δ N-Prot.A (Δ N-Mutante) wurden für die Dauer von 20 und 120 Minuten mit Rapamycin versetzt bzw. unbehandelt weiterinkubiert. Im Anschluss wurden alle Kulturen aufgeteilt, sodass sowohl eine 15-minütige RNA-Markierung mit ^3H -Uracil durchgeführt als auch Gesamtzellextrakte für eine Western-Blot-Analyse hergestellt werden konnten (Abb. 2.25 A). Die mit Hilfe eines Phosphorimagers detektierten 35S-, 27S- und 20S-rRNA-Signale wurden quantifiziert und gegen das Ethidiumbromid-Signal der jeweiligen Gesamt-25S-rRNA abgeglichen (Teilabb. B). Im Gegensatz zu den Vorläufern konnte die neusynthetisierte 25S- und 18S-rRNA in die Analysen nicht miteinbezogen werden, da die Signale von einem Überschuss an unmarkierter rRNA überlagert wurden.

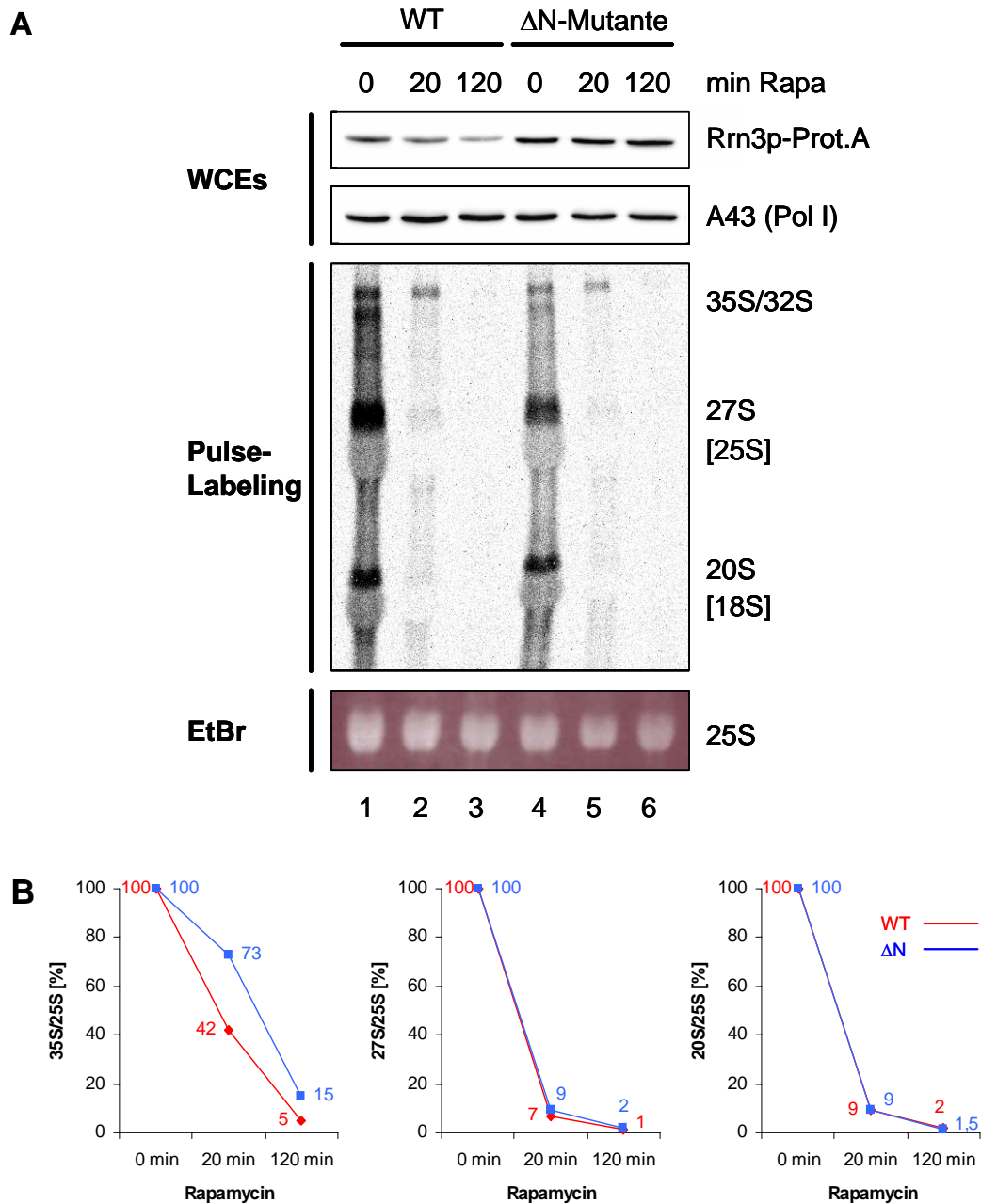


Abb. 2.25: Untersuchung der rRNA-Neusynthese in wachstumsinhibierten Wildtyp- und Rrn3- ΔN -Zellen.

(A) In YPAD-Medium wachsende, logarithmische Zellen der Stämme pNOP1-Rrn3-Prot.A (WT) und pNOP1-Rrn3- ΔN -Prot.A (ΔN -Mutante) wurden 20 und 120 min mit 200 ng/ml Rapamycin behandelt bzw. unbehandelt weiterkultiviert (Zeitpunkt: 0 min). Anschließend wurde ein Teil der Zellen unter Hochsalzbedingungen aufgeschlossen, sodass die WCEs (30 μ g) unter Verwendung von PAP-Immunkomplexen und eines α -A43-Antikörpers in einem Western-Blot analysiert werden konnten. Parallel dazu wurden die restlichen Hefen einem 15-minütigen Pulse-Labeling mit 20 μ Ci [5, 6- 3 H]-Uracil ausgesetzt. Von der aus den Zellen isolierten Gesamt-RNA wurden gleiche Mengen (bezogen auf das EtBr-Signal der 25S-rRNA) in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die 3 H-markierten rRNA-Spezies wurden mit Hilfe eines Phosphorimagers sichtbar gemacht.

(B) Die 35S-, 27S- und 20S-rRNA-Signale wurden mit der Image Gauge-Software von Fujifilm quantifiziert, wohingegen die EtBr-Signale der 25S-rRNA mit Hilfe der AIDA-Software (Raytest) bestimmt wurden. Die Diagramme zeigen die relativen Mengen der gegen die jeweilige Gesamt-25S-rRNA abgeglichenen neusynthetisierten Vorläufer.

Wie im mittleren Teil von Abb. 2.25 A zu erkennen ist, wurde in Übereinstimmung mit den Daten von Powers und Walter zunächst die rRNA-Prozessierung beeinträchtigt (20 min-Werte, Spuren 2

und 5), bevor längerfristig auch die 35S-rRNA-Menge herunterreguliert wurde (120 min-Werte, Spuren 3 und 6). Interessanterweise nahm die Menge des Primärtranskripts in der Rrn3- Δ N-Mutante, in der das trunkierte Rrn3p-Prot.A nachweislich nicht abgebaut wurde (siehe WCEs, Spuren 4-6), langsamer ab als im Wildtyp (Teilabb. B, linkes Diagramm), wohingegen sich die 27S- und die 20S-rRNA-Mengen gleich schnell verringerten (mittleres und rechtes Diagramm).

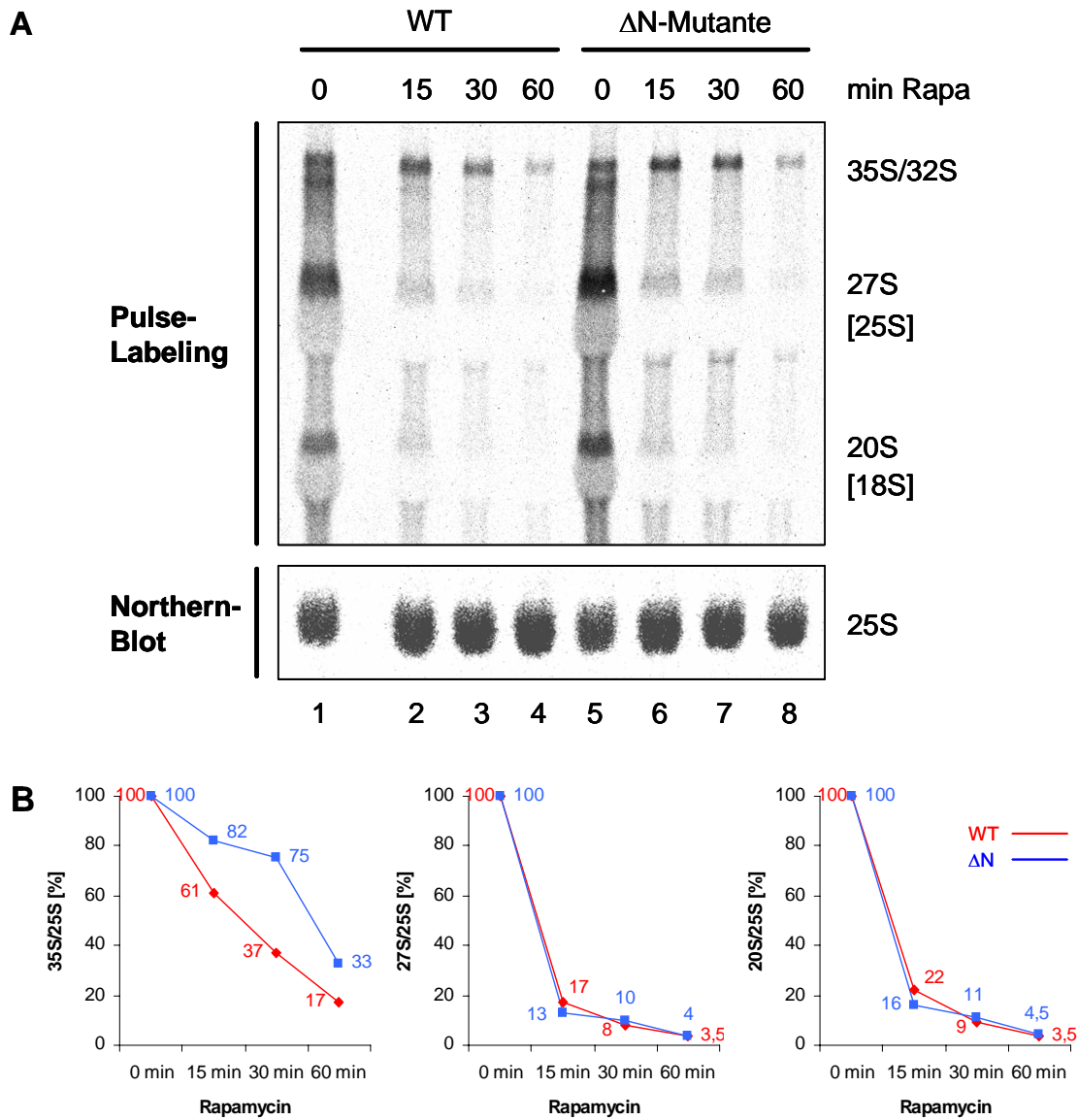


Abb. 2.26: In-vivo-Pulse-Labeling mit wachsenden und rapamycinbehandelten Zellen der Rrn3- Δ N-Mutante und des isogenen Wildtyps.

(A) Wachsende Zellen der Stämme pNOP1-Rrn3-Prot.A (WT) und pNOP1-Rrn3- Δ N-Prot.A (Δ N-Mutante) wurden 15, 30 und 60 min mit 200 ng/ml Rapamycin behandelt bzw. unbehandelt weiterinkubiert (0 min-Werte), bevor mit allen Kulturen ein 15-minütiges Pulse-Labeling mit 20 μ Ci [5, 6- 3 H]-Uracil durchgeführt wurde. Von der aus den Zellen extrahierten Gesamt-RNA wurden gleiche Mengen (bezogen auf das hier nicht gezeigte EtBr-Signal der 25S-rRNA) in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet, sodass die 3 H-markierten rRNA-Spezies mit Hilfe eines Phosphorimagers sichtbar gemacht werden konnten. Danach wurde die Membran mit einer gegen die Gesamt-25S-rRNA gerichteten 32 P-markierten Oligosonde hybridisiert (Northern-Blot).

(B) Die 35S-, 27S- und 20S-rRNA-Signale wurden ebenso wie die 32 P-Signale der jeweiligen Gesamt-25S-rRNA mit Hilfe der Image Gauge-Software von Fujifilm quantifiziert und gegeneinander abgeglichen.

Ein weiteres Experiment, bei dem das RNA-Labeling 15, 30 und 60 Minuten nach der Rapamycinzugabe erfolgte und die Gesamt-25S-rRNA mittels Northern-Blot quantifiziert wurde, lieferte das gleiche Ergebnis (Abb. 2.26 A). Während die Menge der 35S-rRNA in der Deletionsmutante erneut langsamer zurückging als im Wildtyp, wurden die 27S- und die 20S-rRNA-Mengen in beiden Stämmen bereits 15 Minuten nach der Rapamycinzugabe auf ungefähr das gleiche Niveau herunterreguliert (Teilabb. B).

Diese Beobachtungen lassen mehrere Schlussfolgerungen zu: Den 35S-rRNA-Werten nach zu urteilen, wird die RNA-Polymerase I-Transkription in der *Rn3-ΔN*-Mutante langsamer reprimiert als im WT-Stamm. Demnach trägt der in dieser Arbeit beobachtete *Rn3p*-Abbau dazu bei, dass bei einem Wachstumsarrest die Menge der Pol I-*Rn3p*-Komplexe reduziert, weniger Enzym an die rDNA rekrutiert und infolgedessen die Pol I-Transkription auf Initiationsebene herunterreguliert wird.

Bei genauer Betrachtung der Pulse-Experimente fällt allerdings auf, dass sowohl in der *ΔN*-Mutante als auch im Wildtyp die Menge der 35S-rRNA insgesamt stärker abnahm, als es angesichts der noch vorhandenen Komplexmengen und der rDNA-Okkupanzen der Pol I erwartet wurde. Denn während die beiden Stämme nach einer zweistündigen Wachstumsinhibition noch 35 bzw. 64 % der ursprünglich vorhandenen Komplexe enthielten (vgl. Abb. 2.17 A), was sich auch in der Interaktion der Pol I mit der rDNA widerspiegelte (Rückgang auf durchschnittlich 35 bzw. 60 %, siehe Abb. 2.24 B), wurde zum gleichen Zeitpunkt so gut wie keine 35S-rRNA-Neusynthese mehr nachgewiesen (Pulse-Labeling in Abb. 2.25 A). Dies könnte zum einen bedeuten, dass unter ungünstigen Wachstumsbedingungen zusätzlich zur Initiation auch die Elongation der RNA-Polymerase I inhibiert wird. Daneben könnte aber auch Degradation für den starken Rückgang des Primärtranskripts verantwortlich sein. Wie Powers und Walter zeigen konnten, wird in rapamycinbehandelten Hefen nicht nur die rRNA-Synthese sondern ebenso die Transkription der für die ribosomalen Proteine kodierenden Gene (RP-Gene) reprimiert (Powers und Walter, 1999). Gegenwärtig wird davon ausgegangen, dass die deshalb ausbleibende Assemblierung der ribosomalen Proteine an die rRNA-Vorläufer den nach Rapamycinbehandlung zuerst auftretenden Prozessierungsdefekt verursacht und dass in der Folge die nicht mehr prozessierte 35S-rRNA vom Exosom degradiert wird. In diesem Fall könnte die Pol I-Transkription auch zwei Stunden nach Rapamycinbehandlung auf einem Niveau, das der rDNA-Okkupanz des Enzyms entspricht, weiterlaufen. Dann würde allerdings die rRNA-Synthese bei einem Wachstumsarrest weniger über die RNA-Polymerase I-Transkription als vielmehr über die RP-Genexpression reguliert werden. Da bei den hier durchgeführten Pulse-Experimenten bereits nach kurzer Zeit kaum noch neusynthetisierte Prozessierungsprodukte zu erkennen waren, unabhängig davon wieviel Primärtranskript weiter hergestellt wurde, muss ein solcher Regulationsmechanismus ernsthaft in Betracht gezogen werden.

3 DISKUSSION

Die Ribosomenbiogenese stellt in allen eukaryotischen Zellen eine enorme Stoffwechselleistung dar. So können wachsende Zellen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) bei einer Syntheseleistung von 2000 neuen 80S-Ribosomen pro Minute bis zu 200.000 translatierende Partikel enthalten (nach Warner, 1999). Der rRNA-Synthese kommt bei der Herstellung neuer Ribosomen eine besondere Bedeutung zu. Denn die ribosomalen RNAs, die bis zu 80 % der Hefe-RNA ausmachen können, werden im Gegensatz zu den ribosomalen Proteinen nicht im Überschuss produziert und gelten daher bei der Ribosomengenese als die limitierenden Faktoren (nach White, 2005). In Eukaryoten wird die ribosomale RNA von zwei speziellen RNA-Polymerasen synthetisiert, welche sich in ihrer Zusammensetzung und ihren biochemischen Eigenschaften von der RNA-Polymerase II unterscheiden, die die proteinkodierenden Gene transkribiert (Paule und White, 2000). Während die RNA-Polymerase III die 5S-rRNA herstellt, gehen die 28S/25S-, 18S- und die 5,8S-rRNA aus einem von der RNA-Polymerase I (Pol I) transkribierten rRNA-Vorläufer hervor, der in *S. cerevisiae* aufgrund seines Sedimentationsverhaltens 35S-prä-rRNA genannt wird. Das für die Prä-rRNA kodierende rRNA-Gen liegt in den meisten eukaryotischen Zellen in hoher Kopienzahl vor. In *S. cerevisiae* sind durchschnittlich 150 rRNA-Gene tandemartig in einem als rDNA-Lokus bezeichneten Gencluster angeordnet (Warner, 1999). Interessanterweise wird in wachsenden Hefen nur etwa die Hälfte dieser 150 Wiederholungen aktiv transkribiert (offene rDNA-Einheiten). Die andere Hälfte befindet sich hingegen in einem für die RNA-Polymerase I nicht zugänglichen, heterochromatinartigen Zustand (geschlossene rDNA-Einheiten; Conconi et al., 1989; Dammann et al., 1993).

Seit langem ist bekannt, dass die rRNA-Synthese wachstumsabhängig reguliert wird. So werden in der Hefe maximale Pol I-Transkriptionsraten nur dann erreicht, wenn sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase befinden und über ein optimales Nährstoffangebot verfügen. Bereits in der späten Log-Phase wird die rRNA-Synthese merklich herunterreguliert, bevor sie in der stationären Phase vollständig reprimiert wird (Ju und Warner, 1994). Des Weiteren stellen mit Rapamycin behandelte Hefen, in denen die für das Wachstum essenziellen Tor (target of rapamycin)-Kinasen inhibiert wurden, keine neuen rRNAs mehr her (Powers und Walter, 1999). Auch in höheren Eukaryoten findet aktive Pol I-Transkription nur unter günstigen Wachstumsbedingungen statt (Übersicht in Grummt, 1999). Chromatinanalysen machten deutlich, dass die in stationären Hefen beobachtete Inaktivierung der rRNA-Synthese auf zwei Ebenen erfolgt: Zum einen erhöht sich der Anteil der nicht transkribierbaren, heterochromatinartigen rDNA-Einheiten auf weit über 50 %. Darüber hinaus wird die Pol I-Transkription an den verbleibenden offenen rRNA-Genen stark herunterreguliert (Dammann et al., 1993; Sandmeier et al., 2002). In rapamycinbehandelten und aminosäuredepletierten Hefen bleibt das Verhältnis von offenen zu geschlossenen rDNA-Wiederholungen hingegen unverändert, hier scheint die rRNA-Synthese ausschließlich über die Pol I-Transkriptionsrate reguliert zu werden (Claypool et

al., 2004; Merz, 2007). Ähnliches gilt für konfluente Säugerzellen, in denen der Anteil der transkribierbaren rDNA-Einheiten ebenfalls nicht reduziert wird (Conconi et al., 1989).

Nach derzeitigem Kenntnisstand wird die Transkriptionsrate an den einzelnen rRNA-Genen maßgeblich über die Menge der initiationskompetenten RNA-Polymerase I reguliert. Diese zeichnet sich dadurch aus, dass sie in einem stabilen Komplex mit dem Transkriptionsfaktor Rrn3(p) vorliegt (Milkereit und Tschochner, 1998; Yuan et al., 2002). Genetische und biochemische Interaktionsstudien zeigten, dass das monomere Protein Rrn3(p) die Polymerase an den rRNA-Gen-Promotor rekrutiert, indem es sowohl mit dem Enzym als auch mit einem Promotor-gebundenen Initiationsfaktor (Core-Faktor bzw. SL1/TIF-IB) wechselwirkt (Peyroche et al., 2000; Yuan et al., 2002). Nach dem Transkriptionsstart dissoziiert Rrn3(p) wieder von der Polymerase ab, woraufhin diese in ihre elongierende Form übergeht (Milkereit und Tschochner, 1998; Hirschler-Laszkiewicz et al., 2003; Bier et al., 2004). Im Tschochner-Labor konnte der zur Initiation der Pol I-Transkription in vitro benötigte Pol I-Rrn3p-Komplex nur aus wachsenden, nicht aber aus stationären Hefezellen isoliert werden (Milkereit und Tschochner, 1998). Aus einer Arbeit von Claypool und Kollegen geht hervor, dass mit Rapamycin behandelte Hefen die Komplexmenge ebenfalls reduzieren (Claypool et al., 2004). Darüber hinaus weisen auch höhere Eukaryoten den Komplex nur unter günstigen Wachstumsbedingungen auf. In konfluenten, serum- und aminosäuredepletierten sowie rapamycin- und cycloheximidbehandelten Säugerzellen ist dieser hingegen nicht mehr detektierbar (Yuan et al., 2002). Da somit der zur Initiation benötigte Pol I-Rrn3(p)-Komplex und aktive rRNA-Synthese lediglich in wachsenden eukaryotischen Zellen nachgewiesen wurden, wurde ein Modell entwickelt, nach dem die wachstumsabhängige Regulation der rRNA-Synthese überwiegend auf der Ebene der Transkriptionsinitiation über die Menge der Pol I-Rrn3(p)-Komplexe erfolgt.

In Säugern hängen die Komplexbildung und somit die Pol I-Initiation sehr stark vom Phosphorylierungszustand des Rrn3 ab. Nachdem mehrere Phosphorylierungsstellen des murinen Proteins indentifiziert worden waren, konnten die an den Phosphorylierungsreaktionen beteiligten Kinasen, die übergeordneten Signalwege und das jeweilige Wachstumssignal bestimmt werden. Ferner wurde der Einfluss der verschiedenen Rrn3-Phosphorylierungen auf die Pol I-Rrn3-Interaktion, die rDNA-Okkupanz der Pol I und die rRNA-Synthese charakterisiert, sodass mittlerweile eine relativ exakte Vorstellung darüber existiert, wie im Säugersystem positive und negative Wachstumssignale die Pol I-Transkription modulieren (Zhao et al., 2003; Mayer et al., 2004; Mayer et al., 2005). In *S. cerevisiae* weist hingegen die RNA-Polymerase I ein ganz bestimmtes Phosphorylierungsmuster auf, wenn sie mit Rrn3p wechselwirkt. Der Faktor selbst liegt in vivo zwar ebenso wie das Säuger-Rrn3 als Phosphoprotein vor, vermag in vitro allerdings auch in seiner unphosphorylierten Form mit der Polymerase einen initiationskompetenten Komplex auszubilden (Fath et al., 2001). Insofern könnten in der Hefe sowohl Phosphorylierungsreaktionen als auch andere Mechanismen für die Regulation der Pol I-Transkription von Bedeutung sein.

Da zu Beginn dieser Doktorarbeit zwar bekannt war, dass stationäre und rapamycinbehandelte Hefen deutlich geringere Mengen Pol I-Rrn3p-Komplex enthalten als wachsende Zellen, aber nicht erklärt werden konnte, warum die Komplexmenge unter ungünstigen Wachstumsbedingungen

herunterreguliert wird, sollte im Rahmen dieses Projekts nach möglichen Ursachen für den in wachstumsinhibierten *S. cerevisiae*-Zellen stattfindenden Verlust an initiationskompetenten Pol I-Rrn3p-Komplexen gesucht werden. Nachdem die Funktion des Säuger-Rrn3 bereits umfassend charakterisiert wurde, sollte dabei vorrangig analysiert werden, welche Aufgabe dem Hefe-Rrn3p in der wachstumsabhängigen Regulation der rRNA-Synthese zukommt. Der Wachstumsarrest wurde während dieser Promotion entweder durch Aminosäureentzug oder Rapamycinbehandlung ausgelöst. In beiden Fällen kommt es zu einer Inaktivierung der Tor-Signalkaskade.

3.1 In wachstumsarretierten *S. cerevisiae*-Zellen degradiert das 26S-Proteasom einen Großteil des Transkriptionsfaktors Rrn3p

Proteolytische Prozesse spielen im Stoffwechselgeschehen aller pro- und eukaryotischen Organismen eine entscheidende Rolle. Durch Proteinabbau werden unterschiedlichste zelluläre Vorgänge wie Entwicklung und Differenzierung, der Zellzyklus, die Expression zahlreicher Gene, die Signaltransduktion, verschiedene Stoffwechselprozesse, die rezeptorvermittelte Endozytose und die Antigenpräsentation reguliert (nach Ciechanover, 2004). In *S. cerevisiae* kommt der RNA-Polymerase I-abhängigen rRNA-Synthese eine besondere Bedeutung zu. Daher lag es auf der Hand, bei der näheren Charakterisierung der Pol I-Transkription auch proteolytische Regulationsprozesse in Erwägung zu ziehen.

Um feststellen zu können, ob Proteindegradation zu dem in wachstumsarretierten Hefezellen stattfindenden Verlust an initiationskompetenten Pol I-Rrn3p-Komplexen beiträgt, wurden zu Beginn dieser Doktorarbeit die in wachsenden und wachstumsinhibierten Hefen vorkommenden Rrn3p- und Pol I-Proteinmengen mittels Western-Blot analysiert. Dabei zeigte sich, dass aminosäuredepletierte Zellen relativ schnell einen Großteil ihres Rrn3p verlieren, wohingegen die Pol I-Menge unverändert bleibt. Auch nach Rapamycin- und Cycloheximidbehandlung wird die Rrn3p- im Gegensatz zur Pol I-Menge rasch herunterreguliert. Ein deutlicher Rrn3p-Verlust konnte ferner in stationären Hefen beobachtet werden. Somit scheint sich die Rrn3p-Proteinmenge generell zu verringern, wenn Hefen am Wachstum gehindert werden.

Aus einer genomweiten Microarray-Studie (<http://www.yeastgenome.org>) geht hervor, dass die mRNAs des Rrn3p und mehrerer Pol I-Untereinheiten bei Aminosäuremangel herunterreguliert werden. Auf Proteinebene reduziert sich hingegen lediglich die Rrn3p-Menge, was auf einen spezifischen, durch den Nährstoffentzug ausgelösten Abbau des Proteins hindeutet.

Sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten wird spezifische Proteolyse durch das sog. Proteasom vermittelt. Die für den Abbau vorgesehenen Proteine werden zunächst kovalent mit einer Polyubiquitinkette verknüpft, bevor sie derartig markiert vom Proteasom aufgenommen und zu kleinen Peptiden degradiert werden. Das 26S-Proteasom, das in der Hefe und zahlreichen anderen

Eukaryoten vorkommt, stellt einen ca. 1,5 MDa großen Multiproteinkomplex dar, der sich aus zwei Subkomplexen zusammensetzt, dem katalytisch aktiven 20S-Core-Partikel und zwei regulatorischen 19S-Partikeln. Die 20S-Einheit besteht in *S. cerevisiae* aus insgesamt 14 verschiedenen Proteinen, wovon jeweils sieben in einem α - bzw. β -Ring angeordnet sind. Indem zwei α - und zwei β -Ringe einen α - β - β - α -Stapel bilden, entsteht in dessen Zentrum ein Hohlraum, in welchem die an den Enden des Zylinders aufgenommenen Substrate abgebaut werden. Die 19S-Einheiten, die den Core-Partikel auf beiden Seiten flankieren, setzen sich aus insgesamt 17 Proteinen zusammen und dienen der Substraterkennung, -entfaltung und -einschleuung (Übersicht in Hochstrasser, 1996; Ciechanover, 2004).

In der Literatur sind verschiedene Hefemutanten beschrieben, mit deren Hilfe proteasomabhängiger Proteinabbau nachgewiesen werden kann. Um feststellen zu können, ob der in wachstumsarretierten Zellen beobachtete Rrn3p-Verlust durch das Proteasom vermittelt wird, wurde in der vorliegenden Arbeit auf den von D. Wolf und Mitarbeitern konstruierten Stamm cim3-1 zurückgegriffen. Dieser im Folgenden als Proteasom-ts-Mutante bezeichnete Stamm weist eine ts- (temperatursensitive) Mutation in der essenziellen 19S-Komponente Cim3p/Sug1p auf, sodass bei Überführung der Zellen auf die restriktive Temperatur der proteasomabhängige Proteinabbau inhibiert wird (Hiller et al., 1996). Indem im Rahmen dieser Arbeit in cim3-1-Zellen gleichzeitig ein Wachstumsarrest induziert und die Proteasomfunktion inaktiviert wurde, konnte demonstriert werden, dass proteasomvermittelte Degradation für den in wachstumsinhibierten Hefen festgestellten Rrn3p-Verlust verantwortlich ist.

In Eukaryoten trägt neben dem Proteasom mit dem lysosomalen/vakuolären System noch eine weitere Maschinerie zum Proteinabbau bei. Während das Proteasom nur ganz bestimmte Proteine, die relativ schnell aus einer Reaktion entfernt werden müssen, degradiert, bauen die Lysosomen/Vakuolen unspezifisch größere Proteinmengen und sogar ganze Zellorganellen ab. Lysosomale/vakuoläre Proteolyse tritt beispielsweise bei längeren Hungerzuständen auf und betrifft vor allem die Komponenten des Zytosols (siehe Thumm, 2000). Obwohl ein vakuolärer Rrn3p-Abbau damit relativ unwahrscheinlich erschien, konnte er dennoch nicht ganz ausgeschlossen werden.

Aus einer Publikation von Teichert und Kollegen geht hervor, dass Hefen, in denen das Gen für die nicht essenzielle vakuoläre Proteinase yscA disruptiert wurde, über eine stark eingeschränkte Vakuolenfunktion verfügen (Teichert et al., 1989). Um eine mögliche Beteiligung der Vakuole am Rrn3p-Abbau nachweisen zu können, wurde daher in der vorliegenden Arbeit eine yscA-Deletionsmutante konstruiert. In dieser verringerte sich die Rrn3p-Menge nach Aminosäureentzug allerdings ähnlich schnell wie im isogenen WT-Stamm, was vermuten lässt, dass der in wachstumsinhibierten Hefen beobachtete Rrn3p-Verlust nicht durch vakuoläre Proteolyse vermittelt wird. Vielmehr scheint ausschließlich das 26S-Proteasom für den Abbau des Faktors verantwortlich zu sein.

3.2 Unterschiedliche Rrn3p-Mengen wirken sich sowohl auf die rRNA-Syntheserate als auch auf das Hefewachstum aus

Wie vorher bereits mehrfach erwähnt wurde, stellen Hefezellen im wachstumsinhibierten Zustand keine neuen rRNAs mehr her. Nachdem zu Beginn dieser Doktorarbeit gezeigt werden konnte, dass der RNA-Polymerase I-spezifische Transkriptionsfaktor Rrn3p nach Auslösung eines Wachstumsarrests größtenteils vom 26S-Proteasom degradiert wird, lag die Vermutung nahe, dass zwischen dem beobachteten Rrn3p-Abbau und der gleichzeitig stattfindenden Inaktivierung der rRNA-Synthese ein Zusammenhang besteht. Um feststellen zu können, ob die Pol I-Transkription tatsächlich über die Rrn3p-Proteinmenge moduliert wird, sollte in wachsenden Hefen die Rrn3p-Expression auf ein Niveau herunterreguliert werden, das demjenigen von wachstumsarrestierten Zellen entspricht.

Wie Garí und Kollegen am Beispiel des Zyklins Cln3p zeigen konnten, lässt sich bei Verwendung des Tetracyclin (Tet)-regulierbaren TetO-Promotors die Expression von Hefegenen über einen weiten Bereich variieren (Gallego et al., 1997; Gari et al., 1997). Das ursprünglich für höhere eukaryotische Zellen entwickelte Tet-System basiert auf einem Tetracyclin-responsiven Transaktivator (tTA), der in Abwesenheit von Tetracyclin an die aus *E. coli* stammenden TetO-Operator-Sequenzen des TetO-Promotors bindet und so die Transkription des nachgeschalteten Gens stimuliert. Nach Zugabe von Tetracyclin komplexiert das Antibiotikum den Transaktivator. Daraufhin kann dieser nicht mehr mit dem TetO-Promotor interagieren, was eine Inaktivierung der Genexpression zur Folge hat (Gossen und Bujard, 1992). Da hierbei die Stärke der Repression von der eingesetzten Tetracyclin-Menge abhängt, kann das Tet-System dazu verwendet werden, die Expression von ausgesuchten Genen auf bestimmte Niveaus einzustellen. Damit besitzt der TetO-Promotor eindeutige Vorteile gegenüber anderen regulierbaren Promotoren, die sich oft nur schwer feinregulieren lassen. Zudem übt Tetracyclin in Konzentrationen bis zu 50 µg/ml keinen störenden Einfluss auf das eukaryotische Wachstum aus, wohingegen die bei der Verwendung anderer Systeme erforderlichen Mediumswechsel das Wachstum beeinträchtigen können (nach Arino und Herrero, 2003).

In *S. cerevisiae* werden zwei Varianten des oben beschriebenen Tet-Systems eingesetzt: Entweder bedient man sich spezieller Expressionsvektoren, die sowohl das Transaktivatorgen als auch den TetO-Promotor beinhalten, oder die beiden Elemente werden mittels homologer Rekombination direkt ins Hefegenom integriert. Um die Bedeutung des Rrn3p-Abbaus analysieren zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit von beiden Möglichkeiten Gebrauch gemacht, wobei die entscheidenden Ergebnisse mit Hilfe des von Herrero und Mitarbeitern konstruierten Vektors pCM185 erzielt wurden (Gari et al., 1997). Mit sieben hintereinander geschalteten TetO-Operator-Einheiten (pTet₇) gewährleistet dieser eine starke Genexpression. Nach Integration einer RRN3-Prot.A-Sequenz in die pCM185-Klonierungsstelle wurde das resultierende Konstrukt in einen Hefestamm mit disruptiertem endogenem RRN3-Gen eingeschleust, sodass die RRN3-Transkription ausschließlich durch den TetO-Promotor kontrolliert wurde.

Ein erster Western-Blot, in dem Gesamtzellextrakte des TetO-Promotor- und eines Wildtyp-Stammes miteinander verglichen wurden, machte deutlich, dass das Rrn3p-Prot.A-Fusionsprotein im pTet₇-Stamm auf einem sehr hohen Niveau exprimiert wird. Durch Zugabe unterschiedlicher Mengen des Tetracyclin-Derivats Doxycyclin (Dox) gelang es, die Rrn3p-Expression in den pTet₇-Zellen auf verschiedene Niveaus einzustellen, wobei sowohl die in wachsenden als auch die in rapamycinbehandelten WT-Hefen vorkommende Rrn3p-Menge erreicht wurde. Damit stand mit dem in dieser Arbeit konstruierten Hefestamm pTet₇-Rrn3-Prot.A ein Werkzeug zur Verfügung, mit dessen Hilfe die Bedeutung des Rrn3p-Abbaus für die wachstumsabhängige Regulation der rRNA-Synthese untersucht werden konnte.

Um die rRNA-Syntheseraten in den einzelnen pTet₇-Kulturen mit unterschiedlicher Rrn3p-Expression bestimmen zu können, wurde ein In-vivo-Pulse-Labeling mit ³H-gelabeltem Uracil durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die in den Hefen vorliegende Rrn3p-Menge die Syntheserate der RNA-Polymerase I direkt beeinflusst. Während Rrn3p überexprimierende pTet₇-Zellen mehr rRNA synthetisierten als solche mit nahezu physiologischer Rrn3p-Expression, stellten pTet₇-Hefen, in denen die Proteinmenge auf das Niveau der rapamycinbehandelten WT-Zellen gesenkt wurde, deutlich weniger rRNA her. Insofern könnte der in wachstumsinhibierten Hefen beobachtete Rrn3p-Abbau in die parallel stattfindende Inaktivierung der rRNA-Synthese involviert sein. Die Rrn3p-Degradation stellt aber keinesfalls die alleinige Ursache für die Repression der rRNA-Synthese dar, denn in pTet₇-Kulturen mit reduzierter Rrn3p-Menge wurde zwar eine verminderte Pol I-Transkriptionsrate, jedoch keine vollständige Inhibition der rRNA-Synthese wie in rapamycinbehandelten Hefen festgestellt.

Durch ein weiteres Pulse-Experiment, bei dem Dox-behandelte Zellen des TetO-Promotor-Stammes zusätzlich mit Rapamycin versetzt wurden, konnte die letzte Schlussfolgerung untermauert werden. Denn die pTet₇-Zellen, in denen der Rrn3p-Level mit der geeigneten Menge Doxycyclin erneut auf das Niveau der wachstumsarretierten WT-Hefen herunterreguliert wurde, stellten die rRNA-Synthese erst nach Rapamycinbehandlung ein. Folglich wird die in wachstumsinhibierten *S. cerevisiae*-Zellen erfolgende Repression der rRNA-Synthese nicht allein durch die gleichzeitig stattfindende Proteolyse des Rrn3p verursacht.

Bei der Analyse des TetO-Promotor-Stammes konnte darüber hinaus eine weitere interessante Beobachtung gemacht werden: Sowohl auf Agar als auch in Flüssigmedium wuchsen diejenigen pTet₇-Hefen, die nur wenig Rrn3p exprimierten und geringere rRNA-Mengen herstellten, um einiges langsamer als pTet₇-Zellen mit annähernd physiologischer Rrn3p-Expression. Des Weiteren zeigten aber auch die Rrn3p überexprimierenden Zellen trotz leicht verstärkter Pol I-Transkription einen deutlichen Wachstumsdefekt. Folglich scheint das Rrn3p-Expressionsniveau nicht nur Auswirkungen auf die Syntheserate der RNA-Polymerase I zu haben, sondern unabhängig davon auch das Hefewachstum zu beeinflussen. Offensichtlich können *S. cerevisiae*-Zellen nur dann optimal wachsen, wenn sie eine ganz bestimmte, nicht zu niedrige, aber auch nicht zu hohe Rrn3p-Menge herstellen.

Für das Wachstum von Säugerzellen scheint das Rrn3-Expressionsniveau hingegen eher von untergeordneter Bedeutung zu sein. Nach Überexpression des Säuger-Rrn3 TIF-1A in HEK293T-Zellen kam es weder zum Absterben von Zellen, noch wurde das Zellwachstum beeinträchtigt (Zhao et al., 2003). Ein Gelfiltrationsexperiment, bei dem ein pTet₇-Gesamtzellextrakt über eine Superose[®] 6-Säule fraktioniert wurde (durchgeführt von Robert Steinbauer), lieferte eine mögliche Erklärung für den Wachstumsdefekt von Rrn3p überexprimierenden Hefezellen. Da dabei ein Großteil des überexprimierten Rrn3p trotz stringenter Pufferbedingungen im mittleren und hohen Molekulargewichtsbereich (≥ 600 kDa) eluierte, kann vermutet werden, dass überschüssiges Rrn3p unspezifisch an hochmolekulare Proteinkomplexe bindet, was möglicherweise deren Funktion und in der Folge das Hefewachstum beeinträchtigt.

3.3 Die verkürzte Rrn3p-Version Rrn3p- Δ N-Prot.A wird unter ungünstigen Wachstumsbedingungen nicht abgebaut

Nachdem in einem früheren Projekt mit dem polyklonalen Peptid-Antikörper α -Rrn3p-NT, der die ersten 10 N-terminalen Aminosäuren des Rrn3p erkennt, lediglich das in wachsenden Hefen exprimierte, nicht aber das in stationären Zellen vorliegende Protein immunpräzipitiert werden konnte, wurde von Stephan Fath der Hefevektor pNOP1-RRN3- Δ 17-Prot.A kloniert. Dieser ermöglicht die Expression eines N-terminal um 17 Aminosäuren verkürzten Fusionsproteins (Rrn3p- Δ N-Prot.A) unter der Kontrolle des NOP1-Promotors. Das Konstrukt und ein parallel hergestellter RRN3-WT-Vektor wurden in einen Hefestamm mit disruptiertem endogenem RRN3-Lokus eingeschleust (Fath, 2002).

Wie sich in dieser Arbeit herausstellte, wird das trunkierte Rrn3p- Δ N-Prot.A nach Aminosäure-depletion im Gegensatz zur Vollängenversion nicht abgebaut. Die erhöhte Stabilität des verkürzten Proteins beruht allerdings nicht, wie anfänglich vermutet, ausschließlich auf der N-terminalen Deletion. Da nach Aminosäureentzug die HA₃-getagte Version des Rrn3p- Δ N genauso effizient degradiert wurde wie das entsprechende WT-Protein, scheinen vielmehr die Deletion und der Prot.A-Tag gemeinsam dafür verantwortlich zu sein, dass das trunkierte Rrn3p- Δ N-Prot.A in wachstumsinhibierten Hefezellen nicht abgebaut wird.

Die unter ungünstigen Wachstumsbedingungen beobachtete erhöhte Stabilität des verkürzten Rrn3p-Prot.A-Fusionsproteins kann verschiedene Ursachen haben. Wie in Kap. 3.1 erläutert wurde, müssen Proteine, die zum Abbau bestimmt sind, mit dem nur 8,5 kDa großen, hoch konservierten Protein Ubiquitin markiert sein, damit sie das Proteasom erkennen, aufnehmen und degradieren kann. Über sein C-terminales Glycin wird dabei das Ubiquitin kovalent mit einem Lysinrest des Substrats verknüpft (Übersicht in Ciechanover, 2004). Das verkürzte Rrn3p-Prot.A könnte wegen des fehlenden N-Terminus beispielsweise strukturell verändert sein, wodurch eine Ubiquitin-Übertragung auf die in Frage kommenden Lysinreste verhindert wird. Denkbar ist auch, dass

aufgrund einer veränderten Proteinstruktur potenzielle Rrn3p-Phosphorylierungsstellen maskiert werden, was ebenfalls Auswirkungen auf die Halbwertszeit des Faktors haben kann. Denn wie u.a. am Beispiel des bei Aminosäuremangel aktivierten Transkriptionsfaktors Gcn4p oder des CDK (cyclin dependent kinase)-Inhibitors Sic1p gezeigt wurde, werden zahlreiche eukaryotische Proteine erst dann ubiquitinyliert und abgebaut, wenn sie vorher durch Phosphorylierung gekennzeichnet wurden (Feldman et al., 1997; Meimoun et al., 2000; Chi et al., 2001). Aus der Dissertation von Stephan Fath geht hervor, dass Rrn3p in vivo als Phosphoprotein vorliegt (Fath et al., 2001). Demnach könnte das WT-Rrn3p in wachstumsarretierten Hefen zunächst phosphoryliert werden, bevor es anschließend mit Ubiquitin verknüpft und proteasomabhängig degradiert wird. Im Gegensatz dazu würden in der Rrn3- Δ N-Mutante die Phosphorylierung des Faktors und somit seine Ubiquitinylierung durch die vermutete Strukturänderung verhindert werden.

Nachdem angesichts der erhöhten Stabilität des Rrn3p- Δ N-Prot.A-Fusionsproteins zunächst angenommen wurde, dass der N-Terminus des Rrn3p für die wachstumsabhängige Regulation der Pol I-Transkription von Bedeutung sein könnte, wurde dieser Frage in Anbetracht des Phänotyps der Rrn3- Δ N-HA₃-Mutante anschließend nicht weiter nachgegangen. Das unter ungünstigen Wachstumsbedingungen stabile Rrn3p- Δ N-Prot.A wurde allerdings in Folgenden dazu verwendet, den Einfluss der Rrn3p-Degradation auf die in wachstumsarretierten Hefen erfolgende Repression der rRNA-Synthese näher zu charakterisieren.

3.4 In wachstumsinhibierten Hefezellen trägt der Abbau des Rrn3p zum Verlust der RNA-Polymerase I-Rrn3p-Komplexe bei

Die mit dem TetO-Promotor-Stamm durchgeführten Pulse-Labeling-Experimente hatten erste Hinweise geliefert, dass der während dieser Promotion beobachtete Rrn3p-Abbau zur Inaktivierung der rRNA-Synthese in wachstumsinhibierten *S. cerevisiae*-Zellen beitragen könnte. Bislang wurde der Verlust an initiationskompetenten Pol I-Rrn3p-Komplexen für die in wachstumsarretierten Hefen erfolgende Repression der rRNA-Synthese verantwortlich gemacht. Daher lag die Vermutung nahe, dass bei einem Wachstumsstopp die Menge der Pol I-Rrn3p-Komplexe über die Rrn3p-Proteinmenge reguliert wird. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde auf die Mutanten pNOP1-Rrn3- Δ N-Prot.A und cim3-1 (Proteasom-ts-Mutante) zurückgegriffen, in denen die Proteolyse des Rrn3p nicht stattfindet bzw. verhindert werden kann.

Um die Pol I-Rrn3p-Interaktion in den genannten Stämmen näher charakterisieren zu können, wurden zunächst Gelfiltrationen durchgeführt. Da interagierende Proteine von Gelfiltrationssäulen koeluieren, kann dieses Verfahren zur Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen herangezogen werden. Im Rahmen eines früheren Projekts wurden nach Auftrennung eines Gesamtzellextrakts von wachsenden WT-Hefen über eine Superose[®] 6-Säule drei Rrn3p-

Subpopulationen identifiziert: Während ein Teil des Proteins in den ersten Fraktionen nach dem Ausschlussvolumen enthalten war, eluierte eine zweite Population zusammen mit der RNA-Polymerase I im mittleren Molekulargewichtsbereich. Der Rest, unkomplexierte Rrn3p-Monomere, wurde in den niedermolekularen Fraktionen gefunden (Bier, 2004; Bier et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte dieses Ergebnis reproduziert werden, wobei die Rrn3p-Monomere fast 70 % und die gemeinsam mit der Polymerase eluierende Subpopulation etwa 20 % des gesamten Rrn3p ausmachten.

In Übereinstimmung mit den zuvor diskutierten Daten enthielten die aminosäuredepletierten Zellen des zur Rrn3- Δ N-Mutante isogenen Wildtyps insgesamt deutlich weniger Rrn3p-Prot.A als die wachsenden WT-Hefen. Vom Abbau des Faktors waren sowohl das mit der Pol I koeluierende als auch das freie Protein betroffen. Im Gegensatz dazu wiesen die wachsenden und wachstumsinhibierten Zellen der Deletionsmutante nicht nur übereinstimmende Mengen Gesamt-Rrn3p, sondern auch gleich große Rrn3p-Subpopulationen auf. Mit der Proteasom-ts-Mutante konnte tendenziell die gleiche Beobachtung gemacht werden. Während in den isogenen WT-Hefen infolge des Wachstumsarrests sowohl die Rrn3p-Gesamtmenge als auch die Menge des zusammen mit der Polymerase eluierenden Proteins stark abnahmen, blieb in der inaktivierten cim3-1-Mutante die Gesamtmenge hingegen gleich, und auch die Menge des in den Pol I-Fractionen enthaltenen Rrn3p verringerte sich nur geringfügig. Da somit in den beiden Mutanten die mit der Pol I koeluierende Rrn3p-Subpopulation nicht bzw. nur unbedeutend kleiner geworden war, bestand Grund zu der Annahme, dass die Menge der Pol I-Rrn3p-Komplexe bei ausbleibender Rrn3p-Degradation nicht reduziert wird. Folglich könnte der zu Beginn dieser Doktorarbeit beobachtete Rrn3p-Abbau für den in wachstumsarretierten Hefen stattfindenden Komplexverlust verantwortlich sein.

Um die Mengen des jeweils mit der RNA-Polymerase I interagierenden Rrn3p exakt quantifizieren zu können, wurde anschließend der Pol I-Rrn3p-Komplex aus Gesamtzellextrakten der beiden Mutanten und der entsprechenden Wildtyp-Stämme über die Pol I-Untereinheit A43 immunpräzipitiert. Wie erwartet enthielt der zur Rrn3- Δ N-Mutante isogene Wildtyp nach Aminosäuredepletion deutlich weniger Pol I-assoziiertes Rrn3p-Prot.A. In der Deletionsmutante wurde ebenfalls weniger Pol I-gebundenes Rrn3p- Δ N-Prot.A nachgewiesen. Während die Komplexmenge im WT allerdings auf ca. 35 % zurückging, verringerte sie sich in der Δ N-Mutante lediglich auf 64 % des Ausgangswertes. In der Proteasom-ts-Mutante zeigte sich ein ähnliches Bild: Die Komplexmenge wurde sowohl in der Mutante als auch im isogenen Wildtyp infolge des Wachstumsarrests herunterreguliert, wobei jedoch der Komplexverlust in den inaktivierten cim3-1-Zellen schwächer ausfiel als in den gleich behandelten WT-Hefen.

Demnach konnte mit Hilfe von Koimmunpräzipitationen gezeigt werden, dass *S. cerevisiae*-Zellen die Menge ihrer Pol I-Rrn3p-Komplexe wohl grundsätzlich reduzieren, sobald sie am Wachstum gehindert werden. Wenn die Komplexkomponente Rrn3p nicht degradiert wird, ist der Komplexverlust allerdings weniger signifikant. Aus dieser Beobachtung kann geschlussfolgert werden, dass der Rrn3p-Abbau zum Verlust der Pol I-Rrn3p-Komplexe in wachstumsarretierten

Hefen beiträgt. Da in den hier untersuchten Mutanten die Menge des Pol I-gebundenen Rrn3p immer stärker abnahm als die Proteingesamtmenge, wird die Komplexbildung aber möglicherweise noch auf einer anderen Ebene reguliert.

In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, wie die RNA-Polymerase I-Transkription in höheren Eukaryoten moduliert wird. Nach Erkenntnissen des Grummt-Labors hängt im Säugersystem die Interaktion zwischen den Komplexbestandteilen in erster Linie vom Phosphorylierungszustand des Säuger-Rrn3 TIF-IA ab. Wie Mayer und Kollegen zeigen konnten, wird der TIF-IA-Rest T200 bei zellulärem Stress von der JNK (c-Jun N-terminal kinase)-Kinase phosphoryliert, was die Dissoziation des Pol I-TIF-IA-Komplexes, eine verminderte Rekrutierung des Enzyms an die rDNA-Promotoren und eine Inhibition der rRNA-Synthese zur Folge hat (Mayer et al., 2005). Die in serumstimulierten Säugerzellen aktivierten Kinasen ERK1/2 (extracellular signal regulated kinases 1/2) und RSK2 (ribosomal S6 kinase 2) phosphorylieren den Faktor an zwei weiteren Aminosäuren (Serin 633 und Serin 649), wobei die S649-Phosphorylierung für die Pol I-Transkription essenziell zu sein scheint (Zhao et al., 2003). Darüber hinaus kontrolliert die mTOR (mammalian target of rapamycin)-Kinase, die bei günstigen Wachstumsbedingungen aktiv ist, den Phosphorylierungszustand des Säuger-Rrn3, denn bei rapamycininduzierter Inaktivierung des TOR-Signalweges wurden eine Dephosphorylierung des TIF-IA-Restes S44 sowie eine Hyperphosphorylierung des Serinrestes 199 beobachtet. Infolge der S199-Phosphorylierung dissoziiert der Präinitiationskomplex, sodass die rDNA-Transkription zum Erliegen kommt (Mayer et al., 2004).

Da die mTOR-Kinase nicht nur durch Rapamycin sondern auch bei Nährstoffmangel inaktiviert wird, könnte der in aminosäuredepletierten Hefen stattfindende Komplexverlust ebenfalls über den Tor-Signalweg vermittelt werden. Allerdings kommt in *S. cerevisiae* eher die RNA-Polymerase I als mögliches Tor-Substrat in Frage. Denn wie Stephan Fath zeigen konnte, muss die Polymerase phosphoryliert sein, um in vitro einen initiationskompetenten Komplex ausbilden zu können, wohingegen Rrn3p auch in seiner unphosphorylierten Form dazu in der Lage ist. Aus der gleichen Arbeit geht hervor, dass die initiiierende Pol I in vivo über ein spezifisches Phosphorylierungsmuster verfügt (Fath et al., 2001). Hong Li und Kollegen konnten die Tor1-Kinase im Nukleus wachsender Hefezellen nachweisen und anhand von Chromatin-IPs zeigen, dass Tor1 direkt oder indirekt mit den Promotoren der rRNA-Gene interagiert (Li et al., 2006a). Insofern wäre es denkbar, dass in wachsenden Hefen Tor1-vermittelte Pol I-Phosphorylierungen die Komplexbildung begünstigen. In wachstumsarretierten Zellen würde dann neben der Rrn3p-Degradation eine durch die Tor-Inaktivierung verursachte Hypophosphorylierung der RNA-Polymerase I zum Verlust der Pol I-Rrn3p-Komplexe beitragen.

Auch wenn das mit der Pol I assoziierte, an der Ausbildung des Präinitiationskomplexes beteiligte Rrn3p aufgrund der In-vitro-Daten wohl eher kein Tor1-Substrat darstellt, könnte der bei einem Wachstumsarrest stattfindende Komplexverlust dennoch über Rrn3p-Phosphorylierungen vermittelt werden. Ein In-vivo-Labeling mit ³³P-markiertem Orthophosphat machte deutlich, dass es sich bei dem in wachsenden *S. cerevisiae*-Zellen exprimierten Rrn3p um ein Phosphoprotein handelt. In

diesem Zusammenhang konnte zudem demonstriert werden, dass das in wachsenden Hefen vorliegende Gesamt-Rrn3p stärker phosphoryliert ist als die mit der Pol I interagierende Subpopulation (Fath et al., 2001). Der Phosphorylierungsstatus des in wachstumsinhibierten Zellen vorkommenden Proteins wurde bislang noch nicht analysiert, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass Rrn3p-Phosphorylierungen für den bei ungünstigen Umweltbedingungen beobachteten Komplexverlust mitverantwortlich sind. Genauso könnten Phosphorylierungen an der RNA-Polymerase I neben der Rrn3p-Degradation zur Dissoziation des Komplexes beitragen. In der Tschochner-Gruppe wurden kürzlich eine Rrn3p- sowie zahlreiche Pol I-Phosphorylierungsstellen identifiziert (Steinbauer, 2006; Gerber et al., eingereicht). Eine umfassende funktionelle Analyse soll u.a. klären, ob die einzelnen Phosphorylierungen für die wachstumsabhängige Regulation der RNA-Polymerase I-Transkription von Bedeutung sind.

Nachdem demonstriert werden konnte, dass in wachstumsarretierten *S. cerevisiae*-Zellen die Menge der Pol I-Rrn3p-Komplexe maßgeblich über die Rrn3p-Proteinmenge reguliert wird, sollte anschließend überprüft werden, ob das Rrn3p-Expressionsniveau auch in wachsenden Hefen Auswirkungen auf die Komplexbildung hat. Zu diesem Zweck wurde die Pol I-Rrn3p-Interaktion in zwei Kulturen des Tetracyclin-regulierbaren Stammes pTet₇-Rrn3-Prot.A untersucht, welche nach Zugabe geeigneter Mengen Doxycyclin deutlich mehr Rrn3p-Prot.A exprimierten als wachsende WT-Hefen bzw. etwa genauso viel Fusionsprotein enthielten wie rapamycinbehandelte WT-Zellen. Im pTet₇-Stamm verfügt keine der Pol I-Untereinheiten über einen Affinitätstag, sodass der Pol I-Rrn3p-Komplex über den Prot.A-Anteil des Rrn3p-Fusionsproteins immunpräzipitiert werden musste. Da die verschiedenen Gesamtzellextrakte ungleiche Mengen Rrn3p aufwiesen, wurden unterschiedliche Mengen des Proteins angereichert. Aufgrund dessen war es nicht möglich, die jeweils kopräzipitierten RNA-Polymerase I-Mengen direkt miteinander zu vergleichen. Dennoch zeigte der zur Auswertung der Co-IPs durchgeführte Western-Blot, dass die pTet₇-Lysate in Abhängigkeit von der jeweiligen Rrn3p-Gesamtmenge unterschiedliche Mengen Pol I-Rrn3p-Komplex enthielten.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem in Kap. 3.2 diskutierten Pulse-Labeling-Experiment, bei dem eine Abhängigkeit der rRNA-Syntheserate vom Rrn3p-Expressionsniveau beobachtet wurde. Da bei einer Überexpression des Faktors anscheinend mehr initiationskompetenter Pol I-Rrn3p-Komplex ausgebildet wird, kann offensichtlich mehr neue rRNA synthetisiert werden. Umgekehrt wird die Pol I-Transkription herunterreguliert, wenn aufgrund verminderter Rrn3p-Expression die Komplexmenge reduziert wird. Diesen Überlegungen zufolge müssten Rrn3p überexprimierende pTet₇-Hefen eine höhere Initiationsrate und infolgedessen größere Mengen rDNA-assoziierte RNA-Polymerase I aufweisen als Zellen mit niedrigem Rrn3p-Expressionsniveau. Mit Hilfe von Chromatin-IPs könnte die rDNA-Okkupanz der Pol I in den verschiedenen pTet₇-Kulturen bestimmt und so die Analyse des TetO-Promotor-Stammes abgerundet werden.

3.5 In wachstumsarretierten Hefezellen findet keine Rrn3p-Relokalisation statt

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Koimmunpräzipitationen hatten zu dem Ergebnis geführt, dass der Verlust der initiationskompetenten Pol I-Rrn3p-Komplexe in wachstumsarretierten *S. cerevisiae*-Zellen teilweise auf den Abbau des Rrn3p zurückzuführen ist. Da sowohl mehrere Pol I-Untereinheiten als auch der Transkriptionsfaktor Rrn3p Phosphorylierungen aufweisen, könnte die Komplexbildung darüber hinaus durch Phosphorylierungsreaktionen beeinflusst werden (siehe Kap. 3.4). Daneben könnte in wachstumsinhibierten Hefen eine Relokalisation der Komplexkomponenten deren Interaktion verhindern.

Bereits publizierte Immunfluoreszenz-Daten belegen, dass die RNA-Polymerase I vom Nukleolus ins Nukleoplasma transloziert, wenn man Hefen durch Rapamycinbehandlung am Wachstum hindert (Tsang et al., 2003). Im Säugersystem wurde hingegen eine Umverteilung des Rrn3/TIF-IA beobachtet. Während überexprimiertes TIF-IA in rapamycinbehandelten HeLa-Zellen nicht mehr im Zellkern, sondern im Zytoplasma detektiert wurde (Mayer et al., 2004), verließ das in MEF (mouse embryonic fibroblasts)-Zellen vorkommende endogene Protein bei zellulärem Stress die Nukleoli und verteilte sich im Nukleoplasma (Mayer et al., 2005). Im Gegensatz dazu wurde eine wachstumsabhängige Relokalisation des Hefe-Rrn3p bislang nicht beschrieben. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob das einer systematischen Studie zufolge im Nukleolus und Nukleoplasma vorliegende Rrn3p (siehe Huh et al., 2003) bei einem Wachstumsarrest umverteilt wird.

Zu diesem Zweck wurde zunächst versucht, mittels indirekter Immunfluoreszenz das in einem WT-Hefestamm exprimierte Rrn3p nachzuweisen. Während sich die wachsenden WT-Hefen wie erwartet durch ein starkes nukleoläres sowie durch ein etwas schwächeres nukleäres Rrn3p-Signal auszeichneten, konnte das in den aminosäuredepletierten Zellen vorkommende Rrn3p nicht eindeutig lokalisiert werden, da die Signalintensität wegen der Degradation des Faktors stark abgenommen hatte. Daraufhin wurde die Untersuchung auf die beiden Mutanten ausgeweitet, in denen der wachstumsabhängige Rrn3p-Abbau nicht stattfindet bzw. verhindert werden kann. Beide Stämme lieferten keinerlei Hinweise, dass das Hefe-Rrn3p nach Auslösung eines Wachstumsarrests umverteilt wird. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse von wachsenden und aminosäuredepletierten Zellen der Rrn3- Δ N-Mutante wurde weder eine Translokation der trunkierten Rrn3p-Version ins Zytoplasma noch eine Relokalisation zwischen Nukleolus und Nukleoplasma beobachtet. Vielmehr zeigte das Protein unabhängig vom Wachstumszustand der Zellen immer die gleiche nukleoläre-nukleäre Verteilung. Eine mit der Deletionsmutante durchgeführte biochemische Fraktionierung bestätigte, dass das Rrn3p- Δ N-Prot.A-Fusionsprotein bei einem Wachstumsarrest nicht ins Zytoplasma transloziert, sondern im Kern verbleibt. Darüber hinaus wurde bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von wachsenden und inaktivierten Zellen der Proteasom-ts-Mutante keine Rrn3p-Relokalisation festgestellt.

Obwohl prinzipiell nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine wachstumsabhängige Umverteilung des Faktors in den hier verwendeten Mutanten aufgrund der jeweiligen Mutation verhindert wird, sprechen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Lokalisationsstudien somit

dagegen, dass das Hefe-Rrn3p bei einem Wachstumsarrest ins Zytoplasma transloziert. Ebenso scheint keine Umverteilung zwischen Nukleolus und Nukleoplasma stattzufinden. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass der wachstumsabhängige Verlust der Pol I-Rrn3p-Komplexe nicht über eine Rrn3p-Relokalisation vermittelt wird. Dagegen könnte die in rapamycinbehandelten Hefen beobachtete Translokation der RNA-Polymerase I vom Nukleolus ins Nukleoplasma dazu führen, dass das Enzym nicht mehr mit dem größtenteils im Nukleolus vorkommenden Rrn3p interagieren kann. Ob die RNA-Polymerase I tatsächlich, wie von Tsang und Kollegen beschrieben, nach Rapamycinbehandlung vollständig den Nukleolus verlässt, darf allerdings angezweifelt werden. Denn die während dieser Promotion durchgeführten ChIP-Analysen belegen ebenso wie bereits publizierte Daten, dass auch wachstumsinhibierte Hefen noch beträchtliche Mengen rDNA-assoziierte Pol I aufweisen (siehe Kap. 3.6 sowie Claypool et al., 2004; Laferte et al., 2006). Die in HeLa- und MEF-Zellen beobachtete Relokalisation des TIF-IA stellt höchstwahrscheinlich ein säugerspezifisches Phänomen dar. Ferner könnte das zytoplasmatische TIF-IA-Signal in rapamycinbehandelten HeLa-Zellen aus der Überexpression des Faktors resultieren. Wenn das Rrn3p der Hefe bei einem Wachstumsarrest nicht ins Zytoplasma transloziert, müsste sein Abbau im Zellkern erfolgen. Obwohl proteasomabhängige Degradation überwiegend im Zytoplasma stattfindet, wurde auch nukleärer Proteinabbau beschrieben. So wird beispielsweise der Hefe-Transkriptionsfaktor Gcn4p im Kern ubiquitinyliert und degradiert (Irniger und Braus, 2003), und auch im Säugersystem unterliegen verschiedene Transkriptionsregulatoren, wie beispielsweise der TGF- β -Effektor Smad2 einer nukleären Proteolyse (Lo und Massague, 1999).

3.6 In wachstumsinhibierten Hefen hängt die rDNA-Okkupanz der RNA-Polymerase I von der Menge der vorhandenen Pol I-Rrn3p-Komplexe ab

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass in der Rrn3- Δ N-Mutante bei einem Wachstumsarrest weniger Pol I-Rrn3p-Komplexe verloren gehen als in den entsprechenden WT-Zellen, konnte anschließend mit Hilfe von Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP-Assays) gezeigt werden, dass sich dieser Unterschied auf die rDNA-Okkupanz der RNA-Polymerase I auswirkt.

Wie bereits erwähnt reduzierte sich die Menge der Pol I-Rrn3p-Komplexe im Wildtyp auf rund 35 % des Ausgangswertes, als mit den Zellen eine Aminosäuredepletion durchgeführt wurde. Aus den in dieser Arbeit präsentierten ChIP-Experimenten geht hervor, dass dabei die Menge der rDNA-assoziierten Pol I sowohl in der Promotorregion als auch im rRNA-Gen auf etwa den gleichen Wert zurückging (30-40 %). In der Literatur sind Chromatin-IPs mit ähnlichem Ausgang beschrieben. Während bei Claypool et al. (2004) nach Rapamycinbehandlung noch 35 % der Pol I-Moleküle mit den rDNA-Promotoren und der 25S-rDNA assoziiert waren, ermittelten Laferté und Kollegen einen Wert von 40 % (Laferte et al., 2006). Darüber hinaus wurde auch bei elektronenmikroskopischen Miller-Spread-Analysen ein durch Rapamycinbehandlung induzierter Rückgang der Pol I-rRNA-Gen-Interaktion auf 36 % beobachtet (Claypool et al., 2004). Im

Gegensatz dazu wurde in den aminosäuredepletierten Zellen der Rrn3-Deletionsmutante deutlich mehr rDNA-assoziiertes Enzym nachgewiesen (Rückgang auf 50-60 % der Ausgangsmenge). Für die Komplexmenge wurde zuvor ein ähnlicher Wert ermittelt (Rückgang auf 64 %). Darüber hinaus wurde mit Hilfe von ChIP-Experimenten die Promotor-Okkupanz der beiden Rrn3p-Versionen bestimmt. Während in den aminosäuredepletierten WT-Hefen noch etwa 40 % des Rrn3p mit dem Bereich um den Transkriptionsstartpunkt interagierten, ging der Wert in der ΔN -Mutante lediglich auf 50 % zurück. Demnach stimmt in den beiden Hefestämmen die rDNA-Okkupanz der RNA-Polymerase I mit der des Rrn3p überein.

Angesichts der Tatsache, dass unter ungünstigen Wachstumsbedingungen die Menge der Pol I-Rrn3p-Komplexe und die Menge des rDNA-assoziierten Enzyms in beiden Stämmen auf ungefähr den gleichen Wert herunterreguliert wurden, scheint bei einem Wachstumsarrest die rDNA-Okkupanz der Pol I von der in den Zellen vorliegenden Komplexmenge abzuhängen. Da diese wiederum maßgeblich über die Rrn3p-Proteinmenge moduliert wird, ist somit der Rrn3p-Abbau mit dafür verantwortlich, dass in wachstumsinhibierten Hefezellen weniger RNA-Polymerase I an die rDNA bindet.

In weiteren ChIP-Experimenten wurde aus den beiden Stämmen der Core-Faktor (CF) angereichert. Die mit den Präzipitaten durchgeführte qPCR-Analyse ließ allerdings keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der Rrn3- ΔN -Mutante erkennen. In beiden Stämmen verringerte sich die Promotor-Okkupanz des Core-Faktors infolge des Aminosäureentzugs um ca. 20 %. Darüber hinaus wiesen der WT- und der ΔN -Stamm unabhängig vom Wachstumszustand auch gleich viel Promotor-assoziierten Upstream-Activating-Faktor (UAF) auf, wie ein einzelnes, nicht reproduziertes Chromatin-IP-Experiment demonstrierte. Zuvor waren Claypool und Kollegen für den in wachsenden und rapamycinbehandelten Hefen vorkommenden UAF zu dem gleichen Ergebnis gekommen (Claypool et al., 2004). Somit scheinen der UAF und der CF bei einem Wachstumsarrest an der rDNA zu verbleiben, wohingegen die Pol I- und Rrn3p-Okkupanzen deutlich abnehmen. Ob daraus geschlossen werden kann, dass die wachstumsabhängige Regulation der Pol I-Transkription lediglich über die Pol I-Rrn3p-Komplexe vermittelt wird, muss in nachfolgenden Untersuchungen geklärt werden.

3.7 In wachstumsarretierten Hefen trägt der Rrn3p-Abbau zur Repression der RNA-Polymerase I-Transkription bei

In der vorliegenden Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass wachstumsarretierte Zellen der Rrn3- ΔN -Mutante größere Mengen Pol I-Rrn3p-Komplex und aufgrund dessen mehr rDNA-assoziiertes Enzym enthalten als die isogenen WT-Hefen. Um feststellen zu können, ob sich dieser Unterschied auch auf die rRNA-Neusynthese auswirkt, wurden abschließend In-vivo-Pulse-Labelings mit ^3H -markiertem Uracil durchgeführt.

Powers und Walter hatten bei einem mit wachsenden und rapamycinbehandelten Hefen durchgeführten [C^3H_3]-Methionin-Pulse beobachtet, dass nach Inaktivierung der Tor-Kinasen zunächst die rRNA-Prozessierungsprodukte verschwinden, bevor längerfristig auch das Primärtranskript der RNA-Polymerase I, die 35S-prä-rRNA, herunterreguliert wird. Gleichzeitig wird die Transkription der für die ribosomalen Proteine kodierenden Gene (RP-Gene) reprimiert, wie die Autoren mit Hilfe von Northern-Blots zeigen konnten (Powers und Walter, 1999). Mehrere Studien belegen, dass die Depletion einzelner ribosomaler Proteine beider Untereinheiten zu unterschiedlichen rRNA-Prozessierungsdefekten führt (Moritz et al., 1990; van Beekvelt et al., 2001; Ferreira-Cerca et al., 2005). Folglich könnten die Repression der RP-Gen-Transkription und die deshalb ausbleibende Assemblierung der ribosomalen Proteine an die rRNA-Vorläufer für den in rapamycinbehandelten Hefen festgestellten Prozessierungsdefekt verantwortlich sein. Bei dem Pulse-Experiment von Powers und Walter fällt außerdem auf, dass kurz nach der Rapamycinzugabe weit weniger Primärtranskript angehäuft wurde, als man angesichts der rDNA-Okkupanz der Pol I erwarten würde. Daher besteht Grund zu der Annahme, dass bei Inaktivierung der Tor-Kinasen die nicht mehr prozessierte 35S-rRNA degradiert wird. Eine Publikation von Allmang und Kollegen unterstützt diese Hypothese: Die Autoren konnten zeigen, dass in der Hefe nicht prozessierte rRNA-Spezies von einem als Exosom bezeichneten Multiproteinkomplex abgebaut werden (Allmang et al., 2000). Interessanterweise scheint eine durch den sog. TRAMP (Trf4/Air2/Mtr4-Polyadenylierungs)-Komplex vermittelte 3'-Polyadenylierung die rRNAs für den exosom-abhängigen Abbau zu markieren (Kuai et al., 2004; LaCava et al., 2005).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Pulse-Experimente machten deutlich, dass sowohl in der Rrn3- Δ N-Mutante als auch im isogenen Wildtyp die 35S-rRNA-Synthese herunterreguliert wird, wenn die Zellen mit Rapamycin behandelt werden. Die Menge des Primärtranskripts ging in der Deletionsmutante allerdings deutlich langsamer zurück als im WT-Stamm. Folglich trägt die zu Beginn dieser Promotion beobachtete proteasomabhängige Rrn3p-Degradation dazu bei, dass bei einem Wachstumsarrest geringere Mengen Pol I-Rrn3p-Komplex gebildet werden, weniger Polymerase an die rDNA rekrutiert und infolgedessen weniger 35S-rRNA synthetisiert wird.

3.8 Wie wird bei einem Wachstumsarrest die rRNA-Synthese reprimiert?

Nachdem für wachstumsarretierte *S. cerevisiae*-Zellen eine Abhängigkeit der RNA-Polymerase I-Transkription von der Rrn3p-Proteinmenge demonstriert werden konnte, war es umso erstaunlicher, dass sich die im vorigen Kapitel beschriebenen Unterschiede in der Prä-rRNA-Synthese nicht auf die Prozessierungsprodukte der 35S-rRNA auswirkten. Wie bei Powers und Walter wurde sowohl im WT-Stamm als auch in der Rrn3- Δ N-Mutante die rRNA-Prozessierung schneller eingestellt als die Prä-rRNA-Synthese. Während allerdings die 35S-rRNA-Menge in der Deletionsmutante

langsamer abnahm als im Wildtyp, wurden ein 25S- und ein 18S-rRNA-Vorläufer in beiden Stämmen auf jeweils das gleiche Niveau herunterreguliert.

Folglich muss bei der wachstumsabhängigen Regulation der rRNA-Synthese zwischen der 35S-rRNA-Synthese und der Synthese der reifen rRNAs unterschieden werden. Wie in dieser Arbeit demonstriert werden konnte, ist die in wachstumsarretierten *S. cerevisiae*-Zellen erfolgende Repression der Prä-rRNA-Synthese auf den Verlust an initiationskompetenten Pol I-Rrn3p-Komplexen zurückzuführen, wobei die Komplexmenge maßgeblich über die Rrn3p-Menge moduliert wird. Die Entstehung reifer rRNAs wird hingegen verhindert, weil die rRNA-Prozessierung blockiert wird. Wie bereits erwähnt besteht Grund zu der Annahme, dass die ausbleibende Assemblierung der ribosomalen Proteine an die rRNA-Vorläufer für den in rapamycinbehandelten Hefen beobachteten Prozessierungsdefekt verantwortlich ist. Da sowohl im Rrn3-ΔN- als auch im WT-Stamm bereits nach kurzer Zeit kaum noch rRNA-Prozessierungsprodukte detektiert werden konnten, unabhängig davon wieviel 35S-rRNA synthetisiert wurde, scheint die Repression der RP-Gen-Transkription für die wachstumsabhängige Inaktivierung der rRNA-Synthese von größerer Bedeutung zu sein als die Repression der Pol I-Transkription.

Laferté und Kollegen kamen bei der Analyse eines Hefestammes, der ein Rrn3p-A43-Fusionsprotein anstelle der Einzelproteine exprimiert, zu einem anderen Ergebnis. Indem das Fusionsprotein stöchiometrisch in die RNA-Polymerase I eingebaut wird, entsteht in dem CARA (constitutive association of Rrn3p and A43) genannten Stamm ein nicht dissoziierbarer Pol I-Rrn3p-Komplex. Ähnlich wie die in dieser Arbeit analysierte Rrn3-ΔN-Mutante zeichneten sich rapamycinbehandelte CARA-Zellen gegenüber dem entsprechenden Wildtyp durch mehr rDNA-assoziierte Pol I und eine verzögerte Herunterregulierung der rRNA-Synthese aus. Darüber hinaus wurde in den wachstumsinhibierten CARA-Zellen jedoch eine verstärkte Expression zahlreicher RP-Gene sowie eine Aktivierung der RNA-Polymerase III-abhängigen 5S-rRNA-Synthese beobachtet. Hieraus folgerten die Autoren, dass die RNA-Polymerase I-Transkription bei einem Wachstumsarrest die für die Ribosomenbiogenese relevante Pol II- und Pol III-Transkription kontrolliert (Laferte et al., 2006). Zwar wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit weder die RP-Genexpression noch die 5S-rRNA-Synthese direkt untersucht, doch sprechen die in diesem Kapitel diskutierten Ergebnisse eher gegen eine bei ungünstigen Umweltbedingungen auftretende Dominanz der RNA-Polymerase I-Transkription.

3.9 Wird bei einem Wachstumsarrest auch die elongierende RNA-Polymerase I inhibiert?

Bei der Auswertung der in dieser Arbeit mit der Rrn3-ΔN-Mutante durchgeführten Pulse-Experimente konnte noch eine weitere interessante Beobachtung gemacht werden: Sowohl in der Mutante als auch im WT-Stamm nahm die 35S-rRNA-Menge nach Rapamycinbehandlung stärker

ab, als es die noch vorhandenen Komplexmengen und die rDNA-Okkupanzen der Pol I vermuten ließen. Dies könnte zum einen bedeuten, dass nach Aminosäureentzug und Rapamycinbehandlung nicht nur die Transkriptionsinitiation herunterreguliert, sondern gleichzeitig auch die elongierende Polymerase inhibiert wird. In höheren Eukaryoten wurde eine Inaktivierung der Pol I-Elongation bereits beschrieben. Wie in der Einleitung angedeutet wurde, findet in Säuger- und Pflanzenzellen während der Mitose keine rRNA-Synthese statt (Fan und Penman, 1971; Morcillo et al., 1976). Dennoch bestätigen Immuno-EM- und Fluoreszenzmikroskopie-Studien, dass mitotische rDNA mit Pol I-Molekülen besetzt sein kann, die aber offensichtlich transkriptionsinaktiv sind (Scheer und Rose, 1984; Jordan et al., 1996). Genauso könnte die in wachstumsarretierten Hefen vorkommende rDNA-assoziierte Pol I inhibiert werden. Seit mehr als 20 Jahren ist bekannt, dass das Enzym über fünf phosphorylierte Untereinheiten verfügt (Buhler et al., 1976; Breant et al., 1983). Wie Stephan Fath zeigen konnte, weisen die initiationskompetente und die Gesamt-RNA-Polymerase I unterschiedliche Phosphorylierungsmuster auf. Während in der Rrn3p-assoziierten Form zahlreiche A43-Reste phosphoryliert sind, zeichnet sich die Gesamtpopulation durch eine schwach phosphorylierte A43- und eine stark phosphorylierte A190-Untereinheit aus (Fath et al., 2001). Da es sich bei der Gesamt-Pol I zu einem großen Teil um elongierende Polymerase handelt, besteht Grund zu der Annahme, dass spezifische Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen sowohl in die Initiations- als auch in die Elongationsregulation involviert sind. Momentan werden die von Jochen Gerber identifizierten Pol I-Phosphorylierungsstellen u.a. daraufhin untersucht, ob sie für die Elongationsaktivität des Enzyms von Bedeutung sind (Gerber et al., eingereicht).

Schneider und Kollegen behaupten, dass die Proteine Spt4p und Spt5p, die ursprünglich als Regulatoren der RNA-Polymerase II-Elongation charakterisiert wurden, in wachsenden Hefen auch die Pol I-Elongation beeinflussen. Ob in wachstumsarretierten Zellen die rRNA-Synthese Spt4p/Spt5p-abhängig inhibiert wird, wurde in dieser Arbeit allerdings nicht untersucht (Schneider et al., 2006). Stefanovsky und Kollegen stellten fest, dass die in serumstimulierten NIH3T3-Zellen stattfindende Aktivierung der rDNA-Transkription auf eine bis zu 5-fach gesteigerte Pol I-Elongationsrate zurückzuführen ist (Stefanovsky et al., 2006a). Nach Meinung der Autoren ist das HMG (high mobility group)-Box-Protein UBF (Upstream-Binding-Faktor), das nicht nur an die Promotoren der rRNA-Gene, sondern an die gesamte rDNA bindet, für diesen Effekt verantwortlich. Denn offensichtlich werden bei Serumentzug infolge der UBF-Assoziation die rRNA-Gene in sog. Enhancesomen verpackt, die in ihrer Struktur an Nukleosomen erinnern. Nach einem von Tom Moss vorgeschlagenen Modell blockieren diese Enhancesomen in nicht wachsenden Säugerzellen die Pol I-Elongation. Werden die Zellen jedoch mit Serum oder Wachstumsfaktoren stimuliert, phosphoryliert die dadurch aktivierte ERK-Kinase zwei Serinreste des UBF. In der Folge lockert sich die Struktur der Enhancesomen auf, sodass die rRNA-Gen-gebundenen Pol I-Moleküle mit der Elongation fortfahren können (Übersicht und weitere Referenzen in Stefanovsky et al., 2006a). In *S. cerevisiae* interagiert ebenfalls ein HMG-Box-Protein mit der gesamten rDNA (Hall et al., 2006). Ob der von Gadal und Kollegen als Aktivator der Pol I-Transkription beschreibende Faktor Hmo1p in die Regulation der Pol I-Elongation involviert ist, konnte bislang noch nicht geklärt werden (Gadal et al., 2002).

Der in den Pulse-Experimenten beobachtete unverhältnismäßig starke Rückgang der 35S-rRNA-Menge kann allerdings auch auf Degradationsereignissen beruhen. Wie schon erwähnt besteht Grund zu der Annahme, dass in rapamycinbehandelten Hefen aufgrund der ausbleibenden Assemblierung der ribosomalen Proteine an die rRNA-Vorläufer keine rRNA-Prozessierung mehr stattfindet, und dass in der Folge die unprozessierte 35S-rRNA vom Exosom abgebaut wird. In diesem Fall könnte bei einem Wachstumsarrest die RNA-Polymerase I-Transkription auf einem Niveau, das der rDNA-Okkupanz des Enzyms entspricht, weiterlaufen.

Um feststellen zu können, ob die in wachstumsarretierten Hefezellen mit der rDNA assoziierte RNA-Polymerase I blockiert wird oder nicht, wäre es von Vorteil, über einen aussagekräftigen Transkriptionsassay zu verfügen. Die in dieser Doktorarbeit und von Powers und Walter durchgeführten In-vivo-Pulse-Labelings geben die tatsächliche 35S-rRNA-Synthese wegen der vermuteten rRNA-Degradation unter Umständen nicht korrekt wieder. Möglicherweise könnten durch den Einsatz von rDNA-Promotor-haltigen Reportergenplasmiden bessere Resultate erzielt werden. Daneben könnten Pulse-Labeling-Experimente zu besseren Ergebnissen führen, wenn man statt WT-Hefestämmen Exosommutanten verwenden würde, in denen der rRNA-Abbau abgeschwächt oder sogar ganz verhindert wird.

3.10 Ausblick

Angesichts der in dieser Doktorarbeit präsentierten Ergebnisse muss das Modell zur wachstumsabhängigen Regulation der rRNA-Synthese überdacht werden. Nachdem bislang davon ausgegangen wurde, dass die rRNA-Synthese vor allem auf der Ebene der Transkriptionsinitiation über die Menge der Pol I-Rrn3p-Komplexe reguliert wird, stellte sich nun heraus, dass bei einem Wachstumsarrest die rRNA-Synthese wohl in erster Linie über die Expression der für die ribosomalen Proteine kodierenden Gene kontrolliert wird. Darüber hinaus lassen die hier vorgelegten Daten den Schluss zu, dass unter ungünstigen Wachstumsbedingungen auch die elongierende RNA-Polymerase I einer Regulation unterliegt. Nachfolgende Arbeiten sollten sich daher mit einer möglichen Elongationsregulation auseinandersetzen. Zudem könnte untersucht werden, ob der Transkriptionsfaktor Rrn3p durch Phosphorylierungen für den proteasomabhängigen Abbau markiert wird. Vor allem aber wäre es interessant zu erfahren, welcher zusätzliche Mechanismus in wachstumsarretierten Hefen neben der Rrn3p-Degradation zum Verlust der initiationskompetenten Pol I-Rrn3p-Komplexe beiträgt.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Chemikalien und Reagenzien und deren Bezugsquellen

Die gängigen Laborchemikalien wurden von den Firmen Fluka, Merck, Roth, Serva und Sigma-Aldrich bezogen und werden an dieser Stelle nicht extra aufgelistet. Darüber hinaus kamen folgende Chemikalien und Reagenzien zum Einsatz:

Adenin (BIO 101[®] Systems), Agarose (Electrophoresis Grade, Invitrogen), Ammoniumperoxydisulfat (APS, Fluka), Ampicillin Na-Salz (Roth, 4 °C), Bacto[™] Agar (BD Biosciences), Bacto[™] Peptone (BD Biosciences), Bacto[™] Tryptone (BD Biosciences), Bacto[™] Yeast Extract (BD Biosciences), Benzamidin (Sigma, 4 °C), Bromphenolblau Na-Salz (Serva), BSA (Rinderserumalbumin) Fraktion V (SAFC, 4 °C), CSM-His-Leu-Trp w/20 mg/l Ade (Complete Supplement Mixture ohne His, Leu, Trp, BIO 101, Inc.), CSM-His-Leu-Ura (Complete Supplement Mixture ohne His, Leu, Ura, Sunrise Science Products), Desoxycholsäure (DOC) Na-Salz (Roth, 4 °C), Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck), Dithiothreitol (DTT, Roth, 4 °C), Ethidiumbromid (10 mg/ml, Roth, 4 °C), Ficoll[®] (Typ 400, Serva), Formaldehyd p.A. 37 % (Merck), Formamid p.A. (Merck), G-418/Geneticin (Gibco), D(+)-Glucose-Monohydrat (Merck), Glycerin \geq 98 % p.A. (Roth), L-Histidin (BIO 101[®] Systems), IPTG (Isopropyl- β -thiogalactosid, Roth, -20 °C), L-Leucin (Sigma), Magermilchpulver (Sucofin), Malzextrakt (Sigma), D(-)-Mannitol (Merck), 2-Mercaptoethanol (14,3 M, Fluka, 4 °C), MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure, Fluka), Nonidet[®] P40 Substitute (USB Corporation), PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid, Roth, 4 °C), Polyethylenglykol 4000 (Roth), Polyvinylpyrrolidon (PVP, Sigma), Ponceau S Na-Salz (Sigma), D(+)-Saccharose (Roth), SDS (Dodecylsulfat Na-Salz, Merck), D(-)-Sorbitol (Merck), TEMED p.A. (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, Roth, 4 °C), Titriplex[®] III p.A. (EDTA, Merck), Trichloressigsäure (Roth), Tris Ultrapure (USB Corporation), Triton[®] X-100 (Fluka), L-Tryptophan (Sigma), Tween 20 (Serva), Uracil (Sigma), YNB + Nitrogen (Yeast Nitrogen Base with Nitrogen, Sunrise Science Products)

4.2 Häufig verwendete Medien und Puffer

4.2.1 Medien

YPD ("yeast extract, peptone, dextrose")	2 % (w/v) Bacto [™] Peptone
	1 % (w/v) Bacto [™] Yeast Extract
	2 % (w/v) Glucose
	(2 % (w/v) Bacto [™] Agar für Agarplatten)
	20 min bei 120 °C autoklavieren

YPAD („yeast extract, peptone, adenine, dextrose“)	2 % (w/v) Bacto™ Peptone 1 % (w/v) Bacto™ Yeast Extract 2 % (w/v) Glucose 100 mg/l Adenin 20 min bei 120 °C autoklavieren
YPD+Geneticin	2 % (w/v) Bacto™ Peptone 1 % (w/v) Bacto™ Yeast Extract 2 % (w/v) Glucose 2 % (w/v) Bacto™ Agar 20 min bei 120 °C autoklavieren, auf ca. 60 °C abkühlen lassen 200 µg/ml Geneticin (G-418) zugeben
SDC-His/Leu/Trp (“synthetic dextrose complete medium“ ohne His, Leu, Trp)	0,67 % (w/v) YNB+Nitrogen 0,063 % (w/v) CSM-His-Leu-Trp w/20 mg/l Ade 2 % (w/v) Glucose je nach Selektionsmedium 20 mg/l Histidin, 100 mg/ml Leucin, 50 mg/l Tryptophan (2 % (w/v) Bacto™ Agar für Agarplatten) 20 min bei 120 °C autoklavieren
SDC-Ura („synthetic dextrose complete medium“ ohne Uracil)	0,67 % (w/v) YNB+Nitrogen 0,065 % (w/v) CSM-His-Leu-Ura 2 % (w/v) Glucose 20 mg/l Histidin, 100 mg/ml Leucin 2 % (w/v) Bacto™ Agar 20 min bei 120 °C autoklavieren
As-Stocklösungen	1 mg/ml Histidin, 5 mg/ml Leucin, 2,5 mg/ml Tryptophan in H ₂ O _{Millipore} steril filtrieren, bei 4 °C aufbewahren
LB (Luria broth)	1 % (w/v) Bacto™ Tryptone 0,5 % (w/v) Bacto™ Yeast Extract 0,5 % (w/v) NaCl (1,5 % (w/v) Bacto™ Agar für Agarplatten) 20 min bei 120 °C autoklavieren
LB _{Amp}	LB-Medium bzw. -Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin (Stocklsg.: 100 mg/ml in H ₂ O _{Millipore} , -20 °C)

4.2.2 Puffer

10x PBS	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 14 mM KH ₂ PO ₄ , 43 mM Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O (pH 7,4)
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA
5x DNA-Probenpuffer	30 % (w/v) Glycerin in TE-Puffer, Bromphenolblau, -20 °C
10x TBE	0,9 M Tris, 0,9 M Borsäure, 20 mM EDTA

Hochsalz-Aufschlusspuffer	20 % (w/v) Glycerin, 150 mM HEPES (pH 7,6), 10 mM MgCl ₂ , 400 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , autoklavieren, bei 4 °C lagern; frisch 5 mM β-Mercaptoethanol zugeben
4x SDS-Probenpuffer	40 % (w/v) Glycerin, 0,25 M Tris/HCl (pH 6,8), 8,4 % (w/v) SDS, 0,57 M β-Mercaptoethanol, Bromphenolblau, -20 °C

4.3 Häufig verwendete Geräte

- Inkubatoren und Schüttler von Memmert, Heraeus und Infors zur Kultivierung von *S. cerevisiae* und *E. coli*
- Zentrifugen: Biofuge pico (Heraeus), Biofuge 15 (Heraeus), Biofuge fresco (Heraeus), CT 4 22 (Jouan), C 4 12 (Jouan), Centrikon T-324 (Kontron), Ultrazentrifuge Centrikon T-1170 (Kontron)
- Thermomixer 5436 und compact (Eppendorf), Heizrührer MR2002 und MR3001 (Heidolph), Vortex REAX 2000 (Heidolph)
- Überkopf-Rotator Roto-Shake Genie™ (Scientific Industries)

4.4 Verwendete Hefestämme, Bakterien, Plasmide und Oligonukleotide

4.4.1 Verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

Tab. 4.1: Bezeichnungen, Datenbank-Nummern, Genotypen und Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme

Bezeichnung	Nr.	Genotyp	Herkunft
BSY420 (1n)	1	MATa ade2-1 can1-100 his3Δ200 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1	Ed Hurt-Labor, Heidelberg
BSY420-Rrn3-Prot.A	/	MATa ade2-1 can1-100 his3Δ200 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 RRN3-TEV-Prot.A-HIS ₇ (HIS)	konstruiert v. Stephan Fath (Fath, 2002)
BSY420-Rrn3-TAP	/	MATa ade2-1 can1-100 his3Δ200 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 RRN3-TAP(TRP1)	konstruiert v. Stephan Fath (Fath, 2002)
YPH499	/	MATa ade2-101 ura3-52 lys2-801 trp1-Δ63 his1-Δ200 leu2-Δ1	unbekannt
YPH499-Rrn3-HA ₃	/	MATa ade2-101 ura3-52 lys2-801 trp1-Δ63 his1-Δ200 leu2-Δ1 RRN3-HA ₃ (HIS)	diese Arbeit
BY4741	206	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0	Euroscarf
BY4741-Rrn3-HA ₃	653	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 RRN3-HA ₃ (HIS)	diese Arbeit
BSY420-Rrn3-TAP-Δpep4	647	MATa ade2-1 can1-100 his3Δ200 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 RRN3-TAP(TRP1) pep4::URA3	diese Arbeit

YWO365	649	MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-Δ1 trp1-Δ63 lys2-801 ade2-101 prc1-1	Dieter Wolf, Stuttgart (Hiller et al., 1996)
YWO365-Rrn3-TAP	651	MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-Δ1 trp1-Δ63 lys2-801 ade2-101 prc1-1 RRN3-TAP(URA3)	diese Arbeit
YWO365-A43-TAP	*	MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-Δ1 trp1-Δ63 lys2-801 ade2-101 prc1-1 RPA43-TAP(URA3)	diese Arbeit
YWO365-A43-TAP-Rrn3-HA ₃	657	MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-Δ1 trp1-Δ63 lys2-801 ade2-101 prc1-1 RPA43-TAP(URA3) RRN3-HA ₃ (HIS)	diese Arbeit
YWO365-Rrn3-TAP-A43-HA ₃	658	MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-Δ1 trp1-Δ63 lys2-801 ade2-101 prc1-1 RPA43-HA ₃ (HIS) RRN3-TAP(URA3)	diese Arbeit
cim3-1 (YWO366)	650	MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-Δ1 prc1-1 cim3-1	Dieter Wolf, Stuttgart (Hiller et al., 1996)
cim3-1-Rrn3-TAP	652	MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-Δ1 prc1-1 cim3-1 RRN3-TAP(URA3)	diese Arbeit
cim3-1-Rrn3-HA ₃	659	MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-Δ1 prc1-1 cim3-1 RRN3-HA ₃ (HIS)	diese Arbeit
cim3-1-A43-TAP-Rrn3-HA ₃	660	MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-Δ1 prc1-1 cim3-1 RPA43-TAP(URA3) RRN3-HA ₃ (HIS)	diese Arbeit
cim3-1-Rrn3-TAP-A43-HA ₃	661	MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-Δ1 prc1-1 cim3-1 RPA43-HA ₃ (HIS) RRN3-TAP(URA3)	diese Arbeit
pTet-Rrn3	654	MATa his3-1 leu2-0 met15-0 URA::CMV-tTA pRRN3::kanR-tetO7-TATA	Open Biosystems
pTet-Rrn3-HA ₃	655	MATa his3-1 leu2-0 met15-0 URA::CMV-tTA pRRN3::kanR-tetO7-TATA RRN3-HA ₃ (HIS)	diese Arbeit
pTet ₂ -Rrn3-Prot.A	666	MATα ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rrn3::HIS3 pCM182-RRN3-Prot.A(TRP1)	diese Arbeit
pTet ₇ -Rrn3-Prot.A	667	MATα ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rrn3::HIS3 pCM185-RRN3-Prot.A(TRP1)	diese Arbeit
NOY604-Rrn3-URA (RRN3-shuffle)	/	MATα ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rrn3::HIS3 YCplac33-RRN3-wt(URA3)	konstruiert v. Stephan Fath (Fath, 2002)
pNOP1-Rrn3-Prot.A	/	MATα ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rrn3::HIS3 pNOP1-RRN3-Prot.A(LEU2)	konstruiert v. Stephan Fath (Fath, 2002)
pNOP1-Rrn3-HA ₃	662	MATα ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rrn3::HIS3 pNOP1-RRN3-HA ₃ (LEU2)	diese Arbeit
pNOP1-Rrn3-HA ₃ -A43-TAP	664	MATα ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rrn3::HIS3 RPA43-TAP(URA3) pNOP1-RRN3-HA ₃ (LEU2)	diese Arbeit
pNOP1-Rrn3-Prot.A-A43-HA ₃	684	MATα ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rrn3::HIS3 RPA43-HIS ₆ -HA ₃ (kanMX6) pNOP1-RRN3-Prot.A(LEU2)	diese Arbeit
pNOP1-Rrn3-Prot.A-Rrn5-HA ₃	688	MATα ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rrn3::HIS3 RRN5-HIS ₆ -HA ₃ (kanMX6) pNOP1-RRN3-Prot.A(LEU2)	diese Arbeit

pNOP1-Rrn3-Prot.A-Rrn6-HA ₃	690	MAT α ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rrn3::HIS3 RRN6-HIS ₆ -HA ₃ (kanMX6) pNOP1-RRN3-Prot.A(LEU2)	diese Arbeit
pNOP1-Rrn3- Δ N-Prot.A	/	MAT α ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rrn3::HIS3 pNOP1-RRN3- Δ 17-Prot.A(LEU2)	konstruiert v. Stephan Fath (Fath, 2002)
pNOP1-Rrn3- Δ N-HA ₃	663	MAT α ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rrn3::HIS3 pNOP1-RRN3- Δ 17-HA ₃ (LEU2)	diese Arbeit
pNOP1-Rrn3- Δ N-HA ₃ -A43-TAP	665	MAT α ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rrn3::HIS3 RPA43-TAP(URA3) pNOP1-RRN3- Δ 17-HA ₃ (LEU2)	diese Arbeit
pNOP1-Rrn3- Δ N-Prot.A-A43-HA ₃	685	MAT α ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rrn3::HIS3 RPA43-HIS ₆ -HA ₃ (kanMX6) pNOP1-RRN3- Δ 17-Prot.A(LEU2)	diese Arbeit
pNOP1-Rrn3- Δ N-Prot.A-Rrn5-HA ₃	689	MAT α ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rrn3::HIS3 RRN5-HIS ₆ -HA ₃ (kanMX6) pNOP1-RRN3- Δ 17-Prot.A(LEU2)	diese Arbeit
pNOP1-Rrn3- Δ N-Prot.A-Rrn6-HA ₃	691	MAT α ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rrn3::HIS3 RRN6-HIS ₆ -HA ₃ (kanMX6) pNOP1-RRN3- Δ 17-Prot.A(LEU2)	diese Arbeit

* nicht in der Stamm-Sammlung abgelegt

4.4.2 Verwendete *E. coli*-Zellen

XL1-Blue Competent Cells (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZAM15 Tn10 (Tet^r)]) von Stratagene

4.4.3 Verwendete Plasmide

Tab. 4.2: Bezeichnungen, Datenbank-Nummern und Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Bezeichnung	Nr.	Herkunft
pBS1479	96	Cellzome (Rigaut et al., 1999)
pBS1539	97	Cellzome (Rigaut et al., 1999)
pYM1	36	Michael Knop, Heidelberg (Knop et al., 1999)
pYM2	37	Michael Knop, Heidelberg (Knop et al., 1999)
pWO139	713	Wolfgang Seufert, Regensburg (Taxis et al., 2002)
pCR [®] 2.1	*	TA Cloning [®] Kit, Invitrogen
pNOP1-RRN3-Prot.A	727	kloniert von Stephan Fath (Fath, 2002)
pNOP1-RRN3-HA ₃	732	diese Arbeit
pNOP1-RRN3- Δ 17-Prot.A	728	kloniert von Stephan Fath (Fath, 2002)
pNOP1-RRN3- Δ 17-HA ₃	733	diese Arbeit

pRS314	62	(Sikorski und Hieter, 1989)
pRS314-RRN3 _{mut} -Prot.A	*	diese Arbeit
pRS314-RRN3 _{WT} -Prot.A	*	diese Arbeit
pCM182	721	Enrique Herrero, Lleida (Gari et al., 1997)
pCM182-RRN3-Prot.A	730	diese Arbeit
pCM185	723	Enrique Herrero, Lleida (Gari et al., 1997)
pCM185-RRN3-Prot.A	731	diese Arbeit

* nicht in der Plasmid-Sammlung abgelegt

4.4.4 Verwendete Oligonukleotide

Alle in dieser Doktorarbeit verwendeten PCR-Primer wurden von MWG-Biotech synthetisiert. Die als Lyophilisat gelieferten Oligonukleotide wurden mit H₂O_{Millipore} in einer Konzentration von 100 pmol/μl angesetzt und bei -20 °C aufbewahrt.

Tab. 4.3: Bezeichnungen, Datenbank-Nummern und Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Nr.	Sequenz
TAP-A43-forward	221	CGA GGA AAA CAC CAG TGA AAG CAA TGA TGG TGA ATC GAG TGA TAG TGA TTC CAT GGA AAA GAG AAG
TAP-A43-reverse	220	CAA TAA CGT ATA TCT TTA TTT GTT TTG ATT TTT TCT CAT TTT TCC CGT CTA CGA CTC ACT ATA GGG
Rrn3-TAP-Forw.	216	TGG AGT GAA GCA AGC GGG GAA TAT GAA AGT GAT GGG TCG GAT GAC TCC ATG GAA AAG AGA AG
Rrn3-TAP-Rev	217	TAG TTT GTG ACG GGC ATG TCT CGA AGA TAC CTA TGA AAA AAG ACC TAC GAC TCA CTA TAG GG
Rrn3-pYM-for.	242	GGA GTG AAG CAA GCG GGG AAT ATG AAA GTG ATG GGT CGG ATG ACC GTA CGC TGC AGG TCG AC
Rrn3-pYM-rev.	243	TAG TTT GTG ACG GGC ATG TCT CGA AGA TAC CTA TGA AAA AAG ACC ATC GAT GAA TTC GAG CTC G
A43-pYM-for.	252	GAA AAC ACC AGT GAA AGC AAT GAT GGT GAA TCG AGT GAT AGT GAT CGT ACG CTG CAG GTC GAC
A43-pYM-rev.	262	CAA TAA CGT ATA TCT TTA TTT GTT TTG ATT TTT TCT CAT TTT TCC CGT CAT CGA TGA ATT CGA GCT CG
RPA43-HIS-HA-f1	861	AGT GAT AGT GAT GCG GCC CAT CAT CAT CAT CAT CAT GCG GCC TAC CCA TAC GAT GTT CCT G
RPA43-HIS-HA-f2	862	GAA AAC ACC AGT GAA AGC AAT GAT GGT GAA TCG AGT GAT AGT GAT GCG GCC
RRN6-HIS-HA-f1	865	CGG GGG TTT GGA GCG GCC CAT CAT CAT CAT CAT CAT GCG GCC TAC CCA TAC GAT GTT CCT G

RRN6-HIS-HA-f2	866	TCT CAA AAA GCC AAA AAG AAG AAG AAA AGG ATC CGG GGG TTT GGA GCG GCC
RRN6-pYM-rev.	867	TAT TAC TTG TTA CAT TGT TTT GAT TAC CTG TGC ACG CAT TAT ACC ATC GAT GAA TTC GAG CTC G
RRN5-HIS-HA-f1	868	TGG TTA TCC AAA GCG GCC CAT CAT CAT CAT CAT CAT GCG GCC TAC CCA TAC GAT GTT CCT G
RRN5-HIS-HA-f2	869	CGA TCA GCA TTA CAT GAA AAT CAG TTG CTA AAA TGG TTA TCC AAA GCG GCC
RRN5-pYM-rev.	870	ATG AAA ACA AAA ATT ATG TCC CTG CGC GAT TTT TCG CAT TGT GTC ATC GAT GAA TTC GAG CTC G
WS103	882	AGC CTA CCA CGT AAG GG
WS104	883	AAG CTC TCT AGA TGG CAG
RRN3-Not1-f.	894	TTT TTT GCG GCC GCA TGA TGG CTT TTG AGA ATA C
RRN3-Not1-r.	895	TTT TTT GCG GCC GCA GAA GTG GCG CGC CCT AG
Rrn3HA-PmeI-F2	901	TTT GTT TAA ACA TTT CTA TGC AGC
Rrn3HA-HindIII-R2	900	TTT AAG CTT TTA CCC TGT TAT CCC TAG
qPCR_4-for	593	GGG CAC CTG TCA CTT TGG A
pPCR_4-rev	594	TTT GCC CTC TCT GTC GCT CT
Prom ChIP-F2	969	TCA TGG AGT ACA AGT GTG AGG A
Prom ChIP-R1	970	TAA CGA ACG ACA AGC CTA CTC
M1	710	TGG AGC AAA GAA ATC ACC GC
M2	711	CCG CTG GAT TAT GGC TGA AC
5S ChIP-F1	920	GCC ATA TCT ACC AGA AAG CAC C
5S ChIP-R1	921	GAT TGC AGC ACC TGA GTT TCG
RRN3-SP1	896	TTT CGA TTG ATG TCG AGT TAC
o9-25S	212	CTC CGC TTA TTG ATA TGC

4.5 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)

4.5.1 Kultur von *S. cerevisiae*

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Kultur der Bäckerhefe *S. cerevisiae* YPD-Medium, ein glukosehaltiges Vollmedium verwendet. Bei der Durchführung von Pulse-Labeling-Experimenten kam YPAD-Medium zum Einsatz, welches zusätzlich 100 mg/l Adenin enthält (siehe Kap. 4.8.2). Wildtyp (WT)-Stämme wurden bei 30 °C, temperatursensitive (ts-) Mutanten hingegen bei 24 °C inkubiert. Während sich die in dieser Arbeit verwendeten WT-Stämme durch Generationszeiten von

ca. zwei Stunden ausgezeichneten, benötigten einige Mutanten inklusive einer ts-Mutante drei bis vier Stunden, um sich zu verdoppeln.

Hefen können sowohl auf Agarplatten als auch in Flüssigmedium kultiviert werden. Zur Durchführung von Experimenten wurde in der Regel in Erlenmeyerkolben autoklaviertes Flüssigmedium verwendet, wobei das Volumen des Mediums, um eine möglichst optimale Luftzufuhr zu gewährleisten, maximal ein Drittel des Gefäßvolumens ausmachte. Zunächst wurden durch Überführen einzelner Hefekolonien in 15-25 ml YPD bzw. YPAD-Medium Vorkulturen angeimpft, welche 24-48 h bei entsprechender Temperatur mit 180 rpm geschüttelt wurden. Mit Hilfe der Vorkulturen wurden dann je nach Experiment 50-400 ml-Hauptkulturen inokuliert. Meistens wurden die Hauptkulturen abends unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdopplungszeit so angeimpft, dass sie sich am nächsten Morgen in der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,5-1$) befanden. Wenn stationäre Hefen benötigt wurden, wurden einzelne Kolonien in 50 ml YPD-Medium überführt und 48 bzw. 72 h lang bei der erforderlichen Temperatur geschüttelt.

4.5.2 Ernte von *S. cerevisiae*-Kulturen

S. cerevisiae-Kulturen wurden hauptsächlich in 50 ml-Falcongefäßen durch eine 3-minütige Zentrifugation mit 3000 rpm bei 4 °C geerntet. Größere Volumina wurden hingegen mit Hilfe eines vorgekühlten Kontron-A6.14-Rotors und der dazugehörigen Zentrifugenbecher 4 min lang mit 3500 rpm abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden einmal mit eiskaltem $H_2O_{\text{Millipore}}$ gewaschen, gegebenenfalls in eiskaltem Lysepuffer resuspendiert (vgl. Kap. 4.9.1) und dann in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden die Hefen bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

4.5.3 Dauerkulturen von *S. cerevisiae*

Zur dauerhaften Lagerung von Hefestämmen wurden 0,85 ml Übernachtskultur (üN-Kultur) in einem sterilen Gefäß mit 0,15 ml sterilem Glycerin ($\geq 98\%$) gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Kulturen wurden bei -80 °C gelagert.

4.5.4 Bestimmung der optischen Dichte von Hefekulturen

Für die meisten im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden exponentiell wachsende Hefen benötigt. Um den Wachstumszustand einer Hefekultur ermitteln zu können, wurde ihre OD_{600} gegen einen Leerwert (Medium) in einem Ultrospec 3100 pro UV/Visible Spectrophotometer von Amersham Biosciences bestimmt. Hefekulturen, die sich in der frühen logarithmischen Phase ($OD_{600} \leq 1,0$) befanden, wurden unverdünnt gemessen, wohingegen spät-logarithmische und stationäre Kulturen 1:10 mit Medium verdünnt wurden.

4.5.5 Messung von Wachstumskurven

Um das Wachstumsverhalten verschiedener Hefestämme miteinander vergleichen zu können, wurden deren Wachstumskurven ermittelt. Dazu wurden aus frischen Vorkulturen aller zu vergleichenden Stämme 20 ml-Kulturen mit einer Start-OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und für 8-10 h bei 30 °C geschüttelt. In regelmäßigen Abständen wurde (wie in Kap. 4.5.4 beschrieben) die OD₆₀₀ der verschiedenen Kulturen gemessen. Wenn auch die stationäre Phase erfasst werden sollte, wurde das Experiment über einen Zeitraum von 48 h durchgeführt. Im Anschluss wurden die Logarithmen (log₁₀) der ermittelten Absorptionen gegen die Zeit aufgetragen.

4.5.6 Phänotypische Charakterisierung von Hefestämmen durch Tüpfeltests

Mit Hilfe von Tüpfeltests kann man Aufschluss über phänotypische Merkmale von Hefestämmen gewinnen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Tüpfeltests wie folgt durchgeführt: Frische Kolonien der zu charakterisierenden Stämme wurden in 1 ml H₂O_{Millipore} resuspendiert. Nach Bestimmung der OD₆₀₀ wurden alle Hefesuspensionen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt. Ausgehend von diesen Ansätzen wurden mit H₂O_{Millipore} 1:10-, 1:100- und 1:1000-Verdünnungen hergestellt. Jeweils 7 µl der vier Verdünnungen wurden auf Agarplatten pipettiert („getüpfelt“), die dann zwei Tage lang bei der erforderlichen Temperatur inkubiert wurden.

4.5.7 Experimente mit temperatursensitiven Hefemutanten

Wenn ein essenzielles Hefegen eine „ts-Mutation“ aufweist, kann das Genprodukt inaktiviert werden, indem der Hefestamm bei einer Temperatur von 37 °C, der sog. restriktiven Temperatur kultiviert wird. Entsprechend wurde der in dieser Arbeit verwendete temperatursensitive Stamm zunächst bei 24 °C inkubiert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 wurden die Zellen abzentrifugiert (3 min, 3000 rpm, RT), zweimal mit 37 °C warmem Medium gewaschen, in vorgewärmtem Medium resuspendiert und bei 37 °C weiterkultiviert.

4.5.8 Durchführung von Aminosäuredepletionen

Wenn Hefen aus Vollmedium in ein synthetisches Mangelmedium überführt werden, dem eine bestimmte Aminosäure fehlt, hören sie auf zu wachsen. Voraussetzung hierfür ist, dass der zu untersuchende Hefestamm für die fehlende Aminosäure auxotroph ist.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Mangelmedien handelte es sich um SDC-Leu und SCD-Trp. Die jeweiligen Hefestämme wurden in YPD-Medium bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase kultiviert. Dann wurden sie bei RT abzentrifugiert (3 min, 3000 rpm) und zweimal mit dem entsprechenden Mangelmedium gewaschen. Anschließend wurden sie im

gleichen Volumen SDC-Leu- bzw. SDC-Trp-Medium resuspendiert, in dem sie zuvor $\bar{u}N$ kultiviert worden waren, und bei der erforderlichen Temperatur weitergeschüttelt.

4.5.9 Behandlung von *S. cerevisiae* mit Rapamycin und Cycloheximid

Durch Behandlung mit Rapamycin oder Cycloheximid werden Hefen am Wachstum gehindert. Während Rapamycin die Tor-Kinasen hemmt, inhibiert Cycloheximid die Translation.

1 mg Rapamycin (-20 °C, Sigma-Aldrich) wurde in 1 ml DMSO gelöst, sodass seine Konzentration 1 mg/ml betrug. Im Gegensatz dazu wurde Cycloheximid (4 °C, Roth) mit $H_2O_{\text{Millipore}}$ in einer Konzentration von 100 mg/ml angesetzt. Beide Stocklösungen wurden aliquotiert und bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert. In den jeweiligen Experimenten wurde Rapamycin in einer Konzentration von 200 ng/ml eingesetzt, Cycloheximid wurde den Hefekulturen in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben.

4.5.10 Behandlung von *S. cerevisiae* mit Doxycyclin

In der vorliegenden Arbeit wurden Hefestämme verwendet, die die Expression des Hefeproteins Rrn3p unter der Kontrolle des 2- bzw. 7-fachen TetO-Promotors ermöglichen (Gari et al., 1997). Unter Einwirkung des Tetracyclin-Analogons Doxycyclin (Dox) konnte die Rrn3p-Expression in einem dieser Stämme über einen weiten Bereich reguliert werden.

Das Antibiotikum Doxycyclin (4 °C, Sigma) wurde mit 50 % $\text{EtOH}_{\text{abs.}}$ zu einer 5 mg/ml Stocklösung angesetzt, welche bei -20 °C aufbewahrt wurde. Um die Auswirkung unterschiedlicher Rrn3p-Mengen auf das Hefewachstum studieren zu können, wurden zum einen doxycyclinhaltige YPD-Agarplatten hergestellt, wobei die Dox-Konzentration zwischen 0,001 und 100 $\mu\text{g/ml}$ variierte. Die erwähnten Hefestämme und ein WT-Kontrollstamm wurden dann auf diesen Platten einem Tüpfeltest unterzogen (siehe Kap. 4.5.6). Darüber hinaus wurden auch Flüssigkulturen mit unterschiedlichen Mengen Doxycyclin behandelt. Da sich der Effekt auf die Rrn3p-Expression nur langsam zeigte, wurde das Antibiotikum den Kulturen bereits 16-18 h vor Durchführung des eigentlichen Experimentes zugegeben.

4.5.11 Transformation von *S. cerevisiae*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *S. cerevisiae*-Zellen zum Einschleusen von linearen DNA-Fragmenten und von Plasmid-DNA nach der Lithiumacetat-Methode transformiert.

Die zu transformierenden Hefestämme wurden in 50 ml YPD-Medium kultiviert. Bei Erreichen einer OD_{600} von 0,5-1,5 wurden die Zellen 3 min mit 3000 rpm abzentrifugiert und in 15,3 μl LiT-Puffer pro OD_{600} und ml Hefekultur resuspendiert. 100 μl Hefesuspension wurden in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt und mit 10 μl Lachssperma-DNA (10 mg/ml, Invitrogen), der zu transformierenden DNA und 500 μl LiT-PEG vermischt. Gewöhnlich wurden 5-10 μg lineare DNA

bzw. 1 µg Plasmid-DNA transformiert. Ein Ansatz ohne DNA fungierte als Negativ-Kontrolle. Die verschiedenen Proben wurden 30-45 min bei RT auf einem Überkopf-Rotator inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl DMSO wurden die Ansätze einer Temperatur von 42 °C ausgesetzt. Während WT-Stämme 15 min lang erhitzt wurden, wurde bei ts-Mutanten der Hitzeschock auf die Dauer von 2 min begrenzt. Anschließend wurden die Hefezellen 30-60 sec mit 3000 rpm zentrifugiert, in 100 µl H₂O_{Millipore} aufgenommen und auf Selektionsmarkerplatten ausplattiert. Wenn sich nach einer 2-6-tägigen Inkubation bei entsprechender Temperatur Kolonien gebildet hatten, wurde ein Teil der vorhandenen Klone nochmals auf dem jeweiligen Selektionsmedium ausgestrichen. Genomische Integrationen wurden mittels Western-Blot (Kap. 4.9.6) oder Kolonie-PCR (Kap. 4.7.6) überprüft.

LiT-Puffer	100 mM LiAc, 10 mM Tris/HCl (pH 7,4), autoklavieren
LiT-PEG	50 % (w/v) PEG 4000 in LiT-Puffer, autoklavieren

4.5.12 Replika-Plattierung

Um möglichst viele Hefeklone auf einmal von einer Selektionsmarkerplatte auf eine andere übertragen zu können, wurde die Replika-Plattierung eingesetzt. Dazu wurde von der Ausgangsplatte mit einem sterilen Samttuch ein Stempelabdruck gemacht, der anschließend auf die frische Platte gedrückt wurde. Diese wurde dann 2 Tage bei der erforderlichen Temperatur inkubiert.

4.5.13 Selektion gegen Hefestämme mit Uracil-Prototrophie mittels 5-FOA

Das Hefegen URA3 kodiert das Enzym Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase, welches für die Uracil-Biosynthese benötigt wird. Dieses Enzym kann auch 5-Fluoroorotische Säure (5-FOA) umsetzen, wobei das für Hefen toxische Produkt 5-Fluorouracil entsteht. Daher können Zellen mit endogenem URA3-Gen nicht auf 5-FOA-haltigem Selektionsmedium wachsen. Befindet sich jedoch das Gen für Uracil-Prototrophie auf einem Plasmid, können die Hefen überleben, wenn sie das Plasmid verlieren (Boeke et al., 1987).

Diese Tatsache macht man sich zunutze, um essenzielle Gene in Hefestämme einzuschleusen, in denen der endogene Locus disruptiert ist. Solche Stämme überleben mit Hilfe eines Plasmids, welches das essenzielle Gen und den URA3-Selektionsmarker trägt. Transformiert man nun einen derartigen Stamm, im Laborjargon als shuffle-Stamm bezeichnet, mit einem weiteren Plasmid, welches ebenfalls das essenzielle Gen, aber einen anderen Selektionsmarker enthält, und plattiert den Transformationsansatz auf SDC+5-FOA-Platten aus, überleben nur diejenigen Klone, die das Plasmid mit dem URA3-Marker verloren und das andere Plasmid aufgenommen haben.

SDC+5-FOA-Platten	0,67 % (w/v) YNB+Nitrogen 0,063 % (w/v) CSM-His-Leu-Trp w/20 mg/l Ade
-------------------	--

2 % (w/v) Glucose
20 mg/l Histidin, 100 mg/ml Leucin, 50 mg/l Tryptophan
2 % (w/v) Bacto™ Agar
20 min bei 120 °C autoklavieren, auf ca. 60 °C abkühlen lassen
0,1 % (w/v) 5-FOA (-20 °C, Toronto Research Chemicals) zugeben

4.5.14 Konstruktion verwendeter *S. cerevisiae*-Stämme

4.5.14.1 Konstruktion von Hefestämmen mit chromosomal integrierten Affinitätstags

Um Western-Blots, Koimmunpräzipitationen und fluoreszenzmikroskopische Studien durchführen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene *S. cerevisiae*-Stämme hergestellt, welche den Transkriptionsfaktor Rrn3p und/oder die RNA-Polymerase I-Untereinheit A43 als TAP (tandem affinity purification)- bzw. HA (Hämagglutinin)-Fusionsproteine exprimieren. Bei der Konstruktion der Stämme wurde folgendermaßen vorgegangen:

Eine DNA-Kassette, welche für den gewünschten Tag und einen Selektionsmarker kodiert, wurde mittels PCR in großer Menge vervielfältigt, wobei die in der PCR-Reaktion eingesetzten Primer abgesehen von einem mit dem Template annealenden Bereich zum 3'-Ende des Zielgens bzw. zur stromabwärts davon liegenden Region komplementäre 5'-Überhänge besaßen. Als daraufhin die jeweiligen Hefen mit dem PCR-Produkt transformiert und auf dem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert wurden, konnten nur diejenigen Zellen Kolonien bilden, die das PCR-Produkt durch homologe Rekombination an der vorgesehenen Stelle in ihr Genom integriert hatten (zur Durchführung der Transformation siehe Kap. 4.5.11). Einige der vorhandenen Klone wurden nochmals auf den jeweiligen Selektionsmarkerplatten ausgestrichen, sodass anschließend Flüssigkulturen angeimpft, Proteinextrakte hergestellt und diese mittels Western-Blot auf das Vorhandensein des gewünschten Fusionsproteins hin überprüft werden konnten (vgl. Kap. 4.9.1 und 4.9.6).

Die TAP-Tag-Kassette wurde ausgehend von dem Plasmid pBS1539 amplifiziert, welches über den auxotrophen Marker URA3 verfügt (Rigaut et al., 1999). Wenn der TAP-Tag mit dem RRN3-Gen fusioniert werden sollte, wurden die PCR-Primer Rrn3-TAP-Forw./Rrn3-TAP-Rev eingesetzt, während im Falle des RPA43-Gens auf die Oligonukleotide TAP-A43-forward/TAP-A43-reverse zurückgegriffen wurde. Zur Vervielfältigung des HA-Moduls wurden die von Knop et al. (1999) konstruierten Plasmide pYM1 und pYM2 verwendet, die neben einer dreifachen HA-Sequenz (HA₃-Tag) den dominanten Marker kanMX6 bzw. den auxotrophen Marker HIS3 beinhalten. Als PCR-Primer kamen hierbei die Oligonukleotide Rrn3-pYM-for./Rrn3-pYM-rev. bzw. A43-pYM-for./A43-pYM-rev. zum Einsatz. Ein einzelner PCR-Ansatz setzte sich in der Regel wie folgt zusammen:

Komponente:	Volumen [μ l]:
10x PCR-Puffer (NEB)	10
10 mM dNTP-Mix (NEB)	10
2,5 pmol/ μ l forward-Primer	10
2,5 pmol/ μ l reverse-Primer	10
Taq-Polymerase (NEB)	0,5
50 ng/ μ l Template	1,0
H ₂ O _{Millipore}	58,5
Gesamtvolumen:	100

Nachfolgend ist das PCR-Programm wiedergegeben, mit dessen Hilfe die TAP-Tag- und die HA₃-Module vervielfältigt wurden (weitere Einzelheiten zur Polymerase-Kettenreaktion in Kap. 4.7.6):

Schritt:	Temperatur:	Dauer:	Anzahl Zyklen:
Denaturierung	94 °C	3 min	1
Denaturierung	94 °C	30 sec.	
Annealing	48 °C bei pBS1539 54 °C bei pYM1/pYM2	2 min	35
Extension	72 °C	2-3 min	
End-Extension	72 °C	6 min	1

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des QIAquick[®] PCR Purification Kits von Qiagen oder des PureLink[™] PCR Purification Kits von Invitrogen aufgereinigt. Bei der Transformation von WT-Stämmen wurden durchschnittlich 5 μ g PCR-Produkt eingesetzt, wohingegen die in dieser Arbeit verwendete ts-Mutante mit 8-10 μ g DNA transformiert wurde.

Tab. 4.4 enthält die im Rahmen dieser Doktorarbeit konstruierten *S. cerevisiae*-Stämme mit chromosomal integrierten Affinitätstags.

Tab. 4.4: Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten *S. cerevisiae*-Stämme mit chromosomal integrierten TAP- und HA₃-Tags. Neben den neu konstruierten Stämmen sind die bei der Transformation verwendeten Stämme sowie die in der jeweiligen PCR-Reaktion eingesetzten Templates und Oligonukleotide angegeben.

Bezeichnung	Ausgangsstamm	PCR-Template	PCR-Primer
YPH499-Rrn3-HA ₃	YPH499	pYM2	Rrn3-pYM-for./Rrn3-pYM-rev.
BY4741-Rrn3-HA ₃	BY4741	pYM2	Rrn3-pYM-for./Rrn3-pYM-rev.
YWO365-Rrn3-TAP	YWO365	pBS1539	Rrn3-TAP-Forw./Rrn3-TAP-Rev
YWO365-Rrn3-TAP-A43-HA ₃	YWO365-Rrn3-TAP	pYM2	A43-pYM-for./A43-pYM-rev.
YWO365-A43-TAP	YWO365	pBS1539	TAP-A43-forward/TAP-A43-reverse
YWO 365-A43-TAP-Rrn3-HA ₃	YWO365-A43-TAP	pYM2	Rrn3-pYM-for./Rrn3-pYM-rev.
cim3-1-Rrn3-TAP	cim3-1	pBS1539	Rrn3-TAP-Forw./Rrn3-TAP-Rev
cim3-1-Rrn3-TAP-A43-HA ₃	cim3-1-Rrn3-TAP	pYM2	A43-pYM-for./A43-pYM-rev.
cim3-1-Rrn3-HA ₃	cim3-1	pYM2	Rrn3-pYM-for./Rrn3-pYM-rev.

cim3-1-A43-TAP-Rrn3-HA ₃	cim3-1-Rrn3-HA ₃	pBS1539	TAP-A43-forward/TAP-A43-reverse
pTet-Rrn3-HA ₃	pTet-Rrn3	pYM2	Rrn3-pYM-for./Rrn3-pYM-rev.
pNOP1-Rrn3-HA ₃ -A43-TAP	pNOP1-Rrn3-HA ₃	pBS1539	TAP-A43-forward/TAP-A43-reverse
pNOP1-Rrn3-ΔN-HA ₃ -A43-TAP	pNOP1-Rrn3-ΔN-HA ₃	pBS1539	TAP-A43-forward/TAP-A43-reverse
pNOP1-Rrn3-Prot.A-A43-HA ₃	pNOP1-Rrn3-Prot.A	pYM1	RPA43-HIS-HA-f1/A43-pYM-rev. RPA43-HIS-HA-f2/ A43-pYM-rev.
pNOP1-Rrn3-Prot.A-Rrn5-HA ₃	pNOP1-Rrn3-Prot.A	pYM1	RRN5-HIS-HA-f1/RRN5-pYM-rev. RRN5-HIS-HA-f2/RRN5-pYM-rev.
pNOP1-Rrn3-Prot.A-Rrn6-HA ₃	pNOP1-Rrn3-Prot.A	pYM1	RRN6-HIS-HA-f1/RRN6-pYM-rev. RRN6-HIS-HA-f2/RRN6-pYM-rev.
pNOP1-Rrn3-ΔN-Prot.A-A43-HA ₃	pNOP1-Rrn3-ΔN-Prot.A	pYM1	RPA43-HIS-HA-f1/A43-pYM-rev. RPA43-HIS-HA-f2/ A43-pYM-rev.
pNOP1-Rrn3-ΔN-Prot.A-Rrn5-HA ₃	pNOP1-Rrn3-ΔN-Prot.A	pYM1	RRN5-HIS-HA-f1/RRN5-pYM-rev. RRN5-HIS-HA-f2/RRN5-pYM-rev.
pNOP1-Rrn3-ΔN-Prot.A-Rrn6-HA ₃	pNOP1-Rrn3-ΔN-Prot.A	pYM1	RRN6-HIS-HA-f1/RRN6-pYM-rev. RRN6-HIS-HA-f2/RRN6-pYM-rev.

Die in der obigen Tabelle aufgeführten Stämme pNOP1-Rrn3-Prot.A-A43-HA₃, pNOP1-Rrn3-Prot.A-Rrn5-HA₃, pNOP1-Rrn3-Prot.A-Rrn6-HA₃, pNOP1-Rrn3-ΔN-Prot.A-A43-HA₃, pNOP1-Rrn3-ΔN-Prot.A-Rrn5-HA₃ und pNOP1-Rrn3-ΔN-Prot.A-Rrn6-HA₃ exprimieren mit einem HIS₆-HA₃-Tag fusionierte Proteine (kurz A43-HA₃, Rrn5p-HA₃ und Rrn6p-HA₃ genannt). Bei der Konstruktion dieser Stämme wurde in einer ersten PCR-Reaktion unter Verwendung des pYM1-Vektors und der Primerpaare ...-f1/...rev. die HA₃-Tag-kanMX6-Kassette amplifiziert. In einer zweiten PCR-Reaktion wurden dann mit Hilfe des ersten PCR-Produkts und der Oligonukleotide ...-f2/...-rev. diejenigen DNA-Fragmente hergestellt, mit denen die Ausgangsstämme transformiert wurden. Die Transformationsansätze wurden auf YPD+Geneticin-Agar ausplattiert und 3-4 Tage bei 30 °C bebrütet. Da die Platten danach mehrere hundert Kolonien (größtenteils transiente Transformanten) aufwiesen, wurde zur Selektionierung der stabilen Transformanten eine Replika-Plattierung durchgeführt. Von den wenigen Klonen, die auf den neuen YPD+Geneticin-Platten gewachsen waren, wurden einige Kolonien unter denaturierenden Bedingungen direkt aufgeschlossen (siehe Kap. 4.9.2). Zur Identifizierung von Klonen mit korrekt integriertem HIS₆-HA₃-Tag wurden die Lysate anschließend einer Western-Blot-Analyse unterzogen.

4.5.14.2 Konstruktion der Stämme pTet₂-Rrn3-Prot.A und pTet₇-Rrn3-Prot.A

Der RRN3-shuffle-Stamm NOY604-Rrn3-URA wurde mit jeweils 1 µg der in dieser Arbeit klonierten Plasmide pCM182-RRN3-Prot.A und pCM185-RRN3-Prot.A transformiert (zur

Klonierungsstrategie siehe Kap. 4.7.11.1). Die Ansätze wurden auf SDC-Trp-Agar ausplattiert und 4 Tage bei 30 °C bebrütet. Anschließend wurden einzelne Klone von den SDC-Trp-Platten sowie eine Positiv- und eine Negativkontrolle auf SDC+5-FOA-Agar ausgestrichen (zum Prinzip der Selektion von Hefestämmen mittels 5-FOA siehe Kap. 4.5.13). Nach einer zweitägigen Inkubation bei 30 °C wurde jeweils ein Klon von den SDC+5-FOA-Platten mittels Western-Blot auf das Vorhandensein des Rrn3p-Prot.A-Fusionsproteins hin überprüft.

4.5.14.3 Konstruktion der Stämme pNOP1-Rrn3-HA₃ und pNOP1-Rrn3-ΔN-HA₃

Der RRN3-shuffle-Stamm NOY604-Rrn3-URA wurde mit jeweils 1 µg der in dieser Arbeit klonierten Plasmide pNOP1-RRN3-HA₃ und pNOP1-RRN3-Δ17-HA₃ transformiert (zur Klonierungsstrategie siehe Kap. 4.7.11.2). Die Ansätze wurden auf SDC-Leu-Agar ausplattiert und 3 Tage bei 30 °C bebrütet. Anschließend wurden einzelne Klone von den SDC-Leu-Platten sowie eine Positiv- und eine Negativkontrolle auf SDC+5-FOA-Agar ausgestrichen (zum Prinzip der Selektion von Hefestämmen mittels 5-FOA siehe Kap. 4.5.13). Nach einer zweitägigen Inkubation bei 30 °C wurde jeweils ein Klon von den SDC+5-FOA-Platten mittels Western-Blot auf das Vorhandensein der jeweiligen Rrn3p-HA₃-Version hin überprüft.

4.5.14.4 Konstruktion des Stammes BSY420-Rrn3-TAP -Δpep4

Durch homologe Rekombination können nicht nur Affinitätstags chromosomal integriert, sondern auch Gene disruptiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in einem WT-Stamm das nicht essenzielle Gen PEP4 deletiert, indem die kodierende Sequenz durch den URA3-Marker ersetzt wurde. Zur Gewinnung der URA3-DNA wurde auf das Plasmid pWO139 zurückgegriffen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Wolfgang Seufert), das eine zur Integration in den PEP4-Lokus geeignete URA3-Sequenz enthält (Δpep4::URA3).

10 µg des Plasmids wurden mit *Sac* I und *Xho* I verdaut. Anschließend wurde die linearisierte DNA in den Hefestamm BSY420-Rrn3-TAP transformiert. Der Ansatz wurde auf SDC-Ura-Agar ausplattiert. Nach einer 5-tägigen Inkubation bei 30 °C wurden einige der vorhandenen Klone nochmals auf SDC-Ura-Medium ausgestrichen und für weitere zwei Tage bei 30 °C bebrütet. Um feststellen zu können, ob in den Transformanten das PEP4-Gen durch die URA3-Sequenz ersetzt wurde, wurden mehrere Klone und der Ausgangsstamm (Negativ-Kontrolle) einer Kolonie-PCR unterzogen (Primerpaar: WS103/WS104). Während Hefen mit intaktem PEP4-Lokus ein 1430 bp langes PCR-Produkt lieferten, zeichneten sich Klone mit Δpep4::URA3-Genotyp durch ein 1280 bp großes PCR-Fragment aus (zur Durchführung der Kolonie-PCR siehe Kap. 4.7.6).

4.6 Arbeiten mit *Escherichia coli* (*E. coli*)

4.6.1 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen (Rubidiumchlorid-Methode)

Aus einem -80 °C-Stock wurde eine Impföse *E. coli*-Bakterien auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und üN bei 37 °C kultiviert. Zur Gewinnung einer Vorkultur wurde eine einzelne *E. coli*-Kolonie in 10 ml LB-Medium überführt und üN bei 37 °C mit 250 rpm geschüttelt. Am folgenden Tag wurden 200 ml LB-Medium mit 2 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C kultiviert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5-0,7 erreicht war. Die Zellen wurden in sterile 50 ml-Falcongefäße überführt, 5 min auf Eis abgekühlt und dann 10 min mit 4500 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in insgesamt 80 ml kaltem Puffer 1 resuspendiert und nochmals 5 min auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (10 min, 4500 rpm, 4 °C) wurden die Zellen in insgesamt 8 ml kaltem Puffer 2 resuspendiert. 200 µl-Aliquots der *E. coli*-Suspension wurden auf vorgekühlte 1,5 ml-Eppendorfgefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Puffer 1	30 mM KAc, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl ₂ , 50 mM MnCl ₂ , 15 % (w/v) Glycerin, pH mit Essigsäure auf 5,8 einstellen, autoklavieren
Puffer 2	10 mM MOPS, 75 mM CaCl ₂ , 10 mM RbCl, 15 % (w/v) Glycerin, pH mit KOH auf 6,5 einstellen, autoklavieren

4.6.2 Transformation von *E. coli*-Bakterien mit Plasmid-DNA

Kompetente *E. coli*-Zellen und die zu transformierende DNA wurden auf Eis aufgetaut. 50-100 µl Bakterien und 100-500 ng Plasmid-DNA (in der Regel 1 µl einer Minipräp) bzw. die Hälfte eines Ligationsansatzes wurden in ein steriles Eppendorfgefäß gegeben, kurz gevortext und 30 min auf Eis inkubiert. Ein Ansatz ohne DNA diente als Negativ-Kontrolle. Anschließend wurden die Zellen 90 sec. lang einer Temperatur von 42 °C ausgesetzt, bevor sie nochmals kurz auf Eis inkubiert wurden. Bakterien, die mit Plasmid-DNA transformiert wurden, wurden sofort auf LB_{Amp}-Agarplatten ausplattiert und üN bei 37 °C kultiviert. Im Gegensatz dazu wurden *E. coli*-Zellen, die mit einem Ligationsansatz transformiert wurden, zunächst in 1 ml LB-Medium aufgenommen, 30-60 min bei 37 °C geschüttelt und erst dann auf LB_{Amp}-Platten verteilt.

4.7 DNA-Techniken

4.7.1 Trennung von DNA in nativen Agarosegelen

Die Agarosegelelektrophorese ist die Methode der Wahl, um DNA-Fragmente von 0,5-25 kb Länge voneinander zu trennen. Da DNA-Moleküle wegen ihrer Phosphatgruppen negativ geladen sind, bewegen sie sich in einem elektrischen Feld zur Anode. Führt man die Elektrophorese in einem Agarosegel durch, wandern kleine Fragmente wegen des Siebeffekts der Agarosematrix schneller durch das Gel als große. Die Konzentration eines Agarosegels hängt davon ab, in welchem Molekulargewichtsbereich die Auftrennung der DNA-Moleküle erfolgen soll. In der vorliegenden Arbeit wurden 0,7-1,2 %ige Gele verwendet.

Zur Herstellung eines Agarosegels wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TBE durch mehrmaliges Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurde die Lösung mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in einen Flachbett-Gelträger gewünschter Größe gegossen, wobei durch das Einsetzen eines Kamms Taschen zur Aufnahme der DNA-Proben erzeugt wurden. Für diese Arbeit wurden sowohl analytische als auch präparative Agarosegele hergestellt. Während sich erstere durch relativ kleine Geltaschen ($V_{\max} \approx 30 \mu\text{l}$) auszeichneten, besaßen letztere weitaus größere Taschen ($V_{\max} \geq 150 \mu\text{l}$), sodass größere Mengen DNA aufgetrennt und anschließend aus der Gelmatrix isoliert werden konnten (vgl. Kap. 4.7.9.3).

Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 5x DNA-Probenpuffer versetzt. Um Größe und Menge der einzelnen DNA-Fragmente abschätzen zu können, wurden zusätzlich 0,5 µg eines geeigneten DNA-Molekulargewichtsstandards (100 bp DNA Ladder bzw. 1 kb DNA Ladder, New England BioLabs) geladen. Die Elektrophorese wurde in einer horizontalen Kammer durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit kam überwiegend eine in der BZH-Werkstatt in Heidelberg gebaute Elektrophoresekammer zum Einsatz (Maße: 27 x 14 x 9 cm, Elektrodenabstand: 25 cm). Als Kammerpuffer diente 1x TBE. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei einer Spannung von 100-150 V. Da das im Gel enthaltene Ethidiumbromid während der Elektrophorese in die DNA interkaliert, können die DNA-Banden im Anschluss mittels UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$) sichtbar gemacht und dokumentiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde hierzu das Gel Max UV-System von INTAS verwendet.

10x TBE	0,9 M Tris, 0,9 M Borsäure, 20 mM EDTA
5x DNA-Probenpuffer	30 % (w/v) Glycerin in TE-Puffer, Bromphenolblau, -20 °C

4.7.2 Trennung von DNA in nativen Polyacrylamidgelen

Polyacrylamidgele (PA-Gele) lösen kleine DNA-Fragmente bis 1000 bp besser auf als Agarosegele. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit kleine PCR-Produkte von 100-500 bp Länge in nativen PA-Gelen analysiert.

Es kamen ausschließlich 12,5 %ige Mini-PA-Gele zum Einsatz, zu deren Herstellung 2,1 ml Polyacrylamid-Stammlösung (Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1), Roth, 4 °C) mit 0,5 ml 10x TBE-Puffer, 50 µl 10 % APS und 3 µl TEMED vermischt wurden. Die Gele wurden in einem Gelgießstand von Bio-Rad zwischen zwei Glasplatten gegossen. Mit Hilfe eines 10er-Kamms wurden bei einer Geldicke von 0,75 mm Taschen erzeugt, die maximal 30 µl Probe aufnehmen konnten. Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Mini-PROTEAN® 3 electrophoresis cell von Bio-Rad durchgeführt, welche für zwei Minigele konzipiert ist. 1x TBE wurde als Kammerpuffer verwendet. Die DNA-Proben wurden vor dem Laden mit 5x DNA-Probenpuffer versetzt. Zur Größenbestimmung der einzelnen Fragmente wurden 0,5 µg der 100 bp DNA Ladder von New England BioLabs mitaufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 150 V durchgeführt und nach 60-75 min beendet. Anschließend wurden die Gele 15 min in wässriger Ethidiumbromid-Lösung (10 µg/ml) inkubiert, sodass die DNA-Banden mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden konnten (siehe Kap. 4.7.1).

4.7.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Konzentration und Reinheit einer Nukleinsäure-Lösung können photometrisch bestimmt werden. Bei einer Wellenlänge von 260 nm ist die von einer nukleinsäurehaltigen Lösung absorbierte UV-Strahlung ihrem Nukleinsäuregehalt direkt proportional. Eine OD_{260} von 1,0 entspricht 50 µg/ml dsDNA, 40 µg/ml RNA oder 33 µg/ml Oligonukleotid-DNA.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich DNA-Konzentrationen bestimmt. Durch eine zusätzliche Messung des Proteingehaltes bei einer Wellenlänge von 280 nm wurde die Reinheit der Präparationen überprüft. Liegt das Verhältnis A_{260}/A_{280} zwischen 1,6 und 1,8, kann von einem hohen Reinheitsgrad der DNA-Proben ausgegangen werden. Niedrigere Werte weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin, wohingegen höhere Werte auf RNA-Kontaminationen schließen lassen. Die Konzentrationsmessungen wurden mit einem Ultrospec 3100 pro-Photometer der Firma Amersham Biosciences durchgeführt. Die DNA-Proben wurden vor der Messung 1:50 oder 1:100 mit $H_2O_{\text{Millipore}}$ verdünnt.

Ferner kann die Konzentration einer DNA-Probe mittels Agarosegelelektrophorese bestimmt werden. Dazu werden das zu quantifizierende DNA-Molekül und ein Molekulargewichtsstandard, wie in Kap. 4.7.1 beschrieben, in einem Agarosegel aufgetrennt. Da die Massen der einzelnen Markerbanden vom Hersteller angegeben werden, kann unter UV-Licht die Konzentration der Probe durch Vergleich mit einer etwa gleich großen Bande des Standards abgeschätzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden auf diese Weise vor allem gering konzentrierte DNA-Proben, wie sie beispielsweise beim Klonieren anfallen, bestimmt.

4.7.4 Plasmidisolierung aus *E. coli* im kleinen Maßstab (Plasmid-Minipräp)

Zur Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde im Rahmen dieser Arbeit das QIAprep® Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen verwendet. Aus 2 ml einer 4 ml-Übernachtskultur konnten durchschnittlich 10-15 µg Plasmid-DNA, gelöst in 50 µl H₂O_{Millipore} gewonnen werden, was einer DNA-Konzentration von 200-300 ng/µl entspricht. Die Plasmidisolierung wurde gemäß dem vom Hersteller angegebenen Protokoll durchgeführt. Anschließend wurde die DNA bei -20 °C gelagert. Der DNA-Gehalt der Plasmidproben wurde photometrisch bestimmt (vgl. Kap. 4.7.3). Reinheit und Qualität der Plasmidpräparationen wurden mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert (vgl. Kap. 4.7.1).

4.7.5 Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Zur Gewinnung der genomischen DNA aus *S. cerevisiae* wurden 2 ml Übernachtskultur in einem 2 ml-Eppendorfgefäß 3 min mit 3000 rpm sedimentiert. Das Pellet wurde in 1 ml H₂O_{Millipore} resuspendiert und nochmals zentrifugiert (2 min, 13.000 rpm, RT). Nach Aufnahme der Zellen in 300 µl Sphäroplastierpuffer wurde der Suspension 1 µl Lyticase (200 U/ml in H₂O_{Millipore}, -20 °C, ICN Biomedicals) zugegeben. Der Ansatz wurde 30-60 min bei 37 °C inkubiert. Die Sphäroplasten wurden pelletiert (2 min, 13.000 rpm, RT) und in 300 µl Lysepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 60 µl 10 % SDS-Lösung wurde der Ansatz 5 min auf 65 °C erhitzt. Anschließend wurde die Probe mit 100 µl 5 M KAc-Lösung versetzt, gevortext und 5 min auf Eis gestellt. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (2 min, 13.000 rpm, RT), woraufhin der Überstand in ein frisches 1,5 ml-Gefäß überführt und mit 300 µl Isopropanol p.A. gemischt wurde. Die gefällte DNA wurde durch eine 2-minütige Zentrifugation mit 13.000 rpm bei RT sedimentiert, mit 300 µl 70 % EtOH_{abs.} gewaschen und in 50 µl H₂O_{Millipore} aufgenommen. Bevor die Probe bei -20 °C gelagert wurde, wurde photometrisch der DNA-Gehalt bestimmt.

Sphäroplastierpuffer	0,9 M Sorbitol, 0,1 M EDTA (pH 8), 50 mM DTT
Lysepuffer	50 mM Tris/HCl (pH 8), 50 mM EDTA (pH 8)

4.7.6 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können selektiv bestimmte DNA-Abschnitte in vitro amplifiziert werden (Saiki et al., 1988). Zu ihrer Durchführung werden spezifische Oligonukleotid-Primer benötigt, welche an den Enden des zu amplifizierenden Bereiches zu jeweils einem DNA-Strang komplementär sind.

Die PCR wird in einem sog. Thermocycler durchgeführt und besteht prinzipiell aus drei Schritten, die kontinuierlich wiederholt werden. Die doppelsträngige DNA-Matrize wird zunächst thermisch

denaturiert. Beim anschließenden Annealing hybridisieren die Primer-Moleküle spezifisch mit den Einzelsträngen. Im Rahmen der sog. Elongations- bzw Extension-Phase werden dann ausgehend von den 3'-Enden der Primer die zu den Matrizensträngen komplementären Stränge synthetisiert. Dies geschieht normalerweise in Gegenwart von Desoxyribonukleotiden mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase, der sog. *Taq*-DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, deren Temperaturoptimum bei 72 °C liegt. Da dieses Enzym relativ ungenau abliest, wird in Fällen, die eine hohe Ablesegenauigkeit erfordern, häufig eine sog. High fidelity-DNA-Polymerase verwendet, welche über eine intrinsische 3'→5'-Exonuklease-Funktion, auch als 3'→5'-Proofreading-Funktion bezeichnet, verfügt. Die drei Schritte Denaturierung, Annealing und Extension werden mehrfach wiederholt, wobei die jeweils synthetisierte DNA im folgenden Zyklus wiederum als Matrize fungiert. Auf diese Weise kommt es zu einer exponentiellen Anreicherung der zwischen den Primern liegenden DNA-Sequenz. Wenn beim Konzipieren der Primerpaare die hybridisierenden Bereiche am 5'-Ende um nicht-komplementäre Abschnitte erweitert werden, erhalten die PCR-Produkte zusätzliche Sequenzen, wie z.B. Restriktionsschnittstellen, und können damit zum Klonieren oder für die homologe Rekombination verwendet werden.

In der vorliegenden Arbeit kamen überwiegend die rekombinante *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/μl) und der dazugehörige Thermo Pol Buffer (10x PCR-Puffer) von New England BioLabs zum Einsatz. Daneben wurde beim Klonieren mit der Vent_R[®]-DNA-Polymerase (2 U/μl), einer High fidelity-DNA-Polymerase aus *Thermococcus litoralis*, gearbeitet, welche von der gleichen Firma bezogen wurde. Der dNTP-Mix stammte ebenfalls von New England BioLabs, wohingegen die Primer bei MWG-Biotech bestellt wurden (vgl. Kap. 4.4.4). Zur Durchführung der PCR wurden meistens Mastermixe hergestellt, welche dann auf 0,5 ml-PCR-Reaktionsgefäße verteilt wurden. Ein einzelner PCR-Ansatz setzte sich gewöhnlich wie folgt zusammen:

Komponente:	Volumen [μl]:
10x PCR-Puffer	10
10 mM dNTP-Mix	10
2,5 pmol/μl forward-Primer	10
2,5 pmol/μl reverse-Primer	10
<i>Taq</i> /Vent _R [®] -Polymerase	0,5
Template	≥ 1,0
H ₂ O _{Millipore}	≤ 58,5
Gesamtvolumen:	100

Als Matrize dienten pro Reaktion entweder 50 ng Plasmid-DNA, 250 ng genomische DNA oder 50 ng PCR-Produkt. Darüber hinaus wurden in einer als Kolonie-PCR bezeichneten Variante anstelle einer in H₂O_{Millipore} gelösten DNA-Matrize frische Hefekolonien als PCR-Template verwendet. Zusätzlich zu den matrizehaltigen PCR-Ansätzen wurde jedes Mal ein Ansatz ohne Template (H₂O-Kontrolle) hergestellt, um die Reinheit der verwendeten Komponenten zu überprüfen.

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler PCR Sprint der Firma Hybaid durchgeführt. Bei allen im Rahmen dieser Arbeit realisierten PCR-Reaktionen wurde das gleiche Standardprotokoll angewandt, wobei allerdings Annealing-Temperatur und -Dauer in Abhängigkeit von der Primer-Zusammensetzung sowie die Elongationszeit je nach Länge des zu amplifizierenden DNA-Bereiches variierten:

Schritt:	Temperatur:	Dauer:	Anzahl Zyklen:
Denaturierung	94 °C	3 min	1
Denaturierung	94 °C	30 sec.	
Annealing	Primer-abhängig	45 sec.-2 min	30-35
Extension	72 °C	1-3 min	
End-Extension	72 °C	6 min	1

Um zu Beginn der PCR eine vollständige Denaturierung der Template-DNA zu gewährleisten, wurde in der Regel für den ersten Zyklus eine verlängerte Denaturierungszeit gewählt. Ebenso wurde nach dem letzten Zyklus zusätzlich elongiert, um vollständig polymerisierte Endprodukte zu erhalten.

Für die oben bereits erwähnte **Kolonie-PCR** wurden im Prinzip die gleichen Reaktionsbedingungen gewählt. Allerdings wurde bei der Herstellung der Mastermixe zunächst auf Zugabe der *Taq*-Polymerase verzichtet. Erst nachdem die zu untersuchenden Hefekolonien in den einzelnen Reaktionsansätzen gründlich resuspendiert und diese 15 min lang in einem Thermomixer bei 99 °C geschüttelt worden waren, wurden den Reaktionen jeweils 0,5 µl *Taq*-Polymerase zugesetzt. Danach wurde das PCR-Programm unter Verzicht auf den anfänglichen 3-minütigen Denaturierungsschritt direkt mit dem ersten Hauptzyklus gestartet.

Ausbeute und Reinheit der PCR-Produkte wurden mittels Agarose- oder Polyacrylamid-gelelektrophorese kontrolliert (vgl. Kap. 4.7.1 und Kap. 4.7.2).

4.7.7 Quantitative PCR (qPCR)

Mit Hilfe der quantitativen PCR (qPCR) kann die in einer Probe vorliegende DNA-Menge exakt quantifiziert werden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die auch als Real-time-PCR bezeichnete Methode angewandt, um ChIP-Assays auszuwerten (vgl. Kap. 4.10).

Das Prinzip der qPCR basiert darauf, dass über die Änderung eines Fluoreszenzsignals der kinetische Verlauf einer PCR-Reaktion, d.h. die Zunahme der DNA-Konzentration im Reaktionsgefäß, erfasst werden kann. Zur Erzeugung des Fluoreszenzsignals stehen verschiedene Systeme zur Verfügung (Farbstoffe, *TaqMan*-Sonden, molecular beacons usw.). In dieser Arbeit wurde mit dem Reagens SYBR-Green I gearbeitet, das unspezifisch in doppelsträngige DNA

eingebaut wird. Da der Farbstoff erst nach Interkalation fluoresziert, ist das gemessene Fluoreszenzsignal direkt proportional zur DNA-Konzentration im Reaktionsgefäß. Somit ist das SYBR-Green-System auf jegliche DNA-Matrize und unterschiedliche Primerpaare anwendbar. Ein Nachteil bei der SYBR-Green-Verwendung ist, dass es in alle im PCR-Ansatz vorliegenden doppelsträngigen DNA-Spezies interkaliert. Daher muss sichergestellt werden, dass in jedem Reaktionsgefäß nur das gewünschte PCR-Produkt synthetisiert wird und keine Primer-Dimere auftreten. Indem nach Beendigung der PCR eine Schmelzkurve gemessen wird, kann ausgeschlossen werden, dass mehrere PCR-Produkte oder Primer-Dimere entstanden sind.

Die qPCR-Analysen wurden in der vorliegenden Doktorarbeit mit Hilfe der HotStar*Taq*-DNA-Polymerase von Qiagen durchgeführt. 1000 µl 10x PCR-Puffer (Qiagen), 800 µl 25 mM MgCl₂-Lösung (Qiagen), 400 µl 10 mM dNTP-Mix (New England BioLabs) und 6470 µl H₂O_{Millipore} wurden zu einem 2x Mastermix (MM) zusammenpipettiert. Die von MWG Biotech gelieferten PCR-Primer wurden mit H₂O_{Millipore} in einer Konzentration von 10 µM angesetzt. Das von Roche stammende SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain wurde 1:400.000 mit DMSO verdünnt. Aus den genannten Komponenten wurden weitere Mastermixe hergestellt. Diese wurden auf 100 µl-Reaktionsgefäße (STRIP tubes 0,1 ml (VE1000) & caps for RotorGene RG-2072/MC/3000, Corbett-Research) verteilt, bevor abschließend die Template-DNA in die Gefäße pipettiert wurde. Ein einzelner PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Komponente:	Volumen [µl]:
MM	9,67
HotStar <i>Taq</i> (5 U/µl)	0,08
1:400.000 SYBR-Green-Stocklsg.	0,25
10 µM forward-Primer	0,40
10 µM reverse-Primer	0,40
H ₂ O _{Millipore}	5,20
DNA	4,00
Gesamtvolumen:	20,0

Beim Template handelte es sich um 1:2000-Verdünnungen der aus den ChIP-Assays hervorgegangenen INPUT-DNA bzw. um 1:400-Verdünnungen der IP-DNA in TE-Puffer. Als Primer kamen die Oligonukleotidpaare qPCR_4-for/qPCR_4-rev, Prom ChIP-F2/Prom ChIP-R1, M1/M2 und 5S ChIP-F1/5S ChIP-R1 zum Einsatz. Jede PCR-Reaktion wurde als Triplikat angesetzt. Ansätze ohne DNA dienten als Negativ-Kontrollen. Für die Analysen wurde das RotorGene RG-3000-Gerät (+ 72-Loch-Rotor) von Corbett-Research verwendet. Das im Rahmen dieser Arbeit angewandte Two-Step-PCR-Programm ist im Folgenden wiedergegeben:

Schritt:	Temperatur:	Dauer:	Anzahl Zyklen:
Aktivierung der HotStar <i>Taq</i>	95 °C	15 min	1
Denaturierung	95 °C	15 sec.	40
Annealing + Extension	60 °C	60 sec.	

Die SYBR-Green-Fluoreszenz wurde am Ende jedes Zyklus gemessen. Während die Anregungswellenlänge bei 470 nm lag, erfolgte die Detektion bei 510 nm („Kanal“ FAM/Sybr). Nach beendeter PCR wurden die Schmelzkurven der einzelnen Ansätze ermittelt, wobei die Temperatur alle 5 sec. in 0,5 °C-Schritten von 60 auf 95 °C erhöht wurde.

Zur Auswertung der qPCR-Daten wurde die RotorGene Analysis-Software (Version 6.1) von Corbett-Research verwendet. Mit Hilfe des Analysemoduls „Comparative Quantitation“ wurden die relativen DNA-Gehalte der einzelnen Ansätze bestimmt. Absolute DNA-Konzentrationsbestimmungen wurden nicht vorgenommen. Die relativen DNA-Mengen wurden mit Hilfe des MS-Office-Programms Excel 2003 weiter ausgewertet.

4.7.8 Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur Entfernung von Oligonukleotid-Primern und anderen Bestandteilen der PCR-Ansätze wurden PCR-Produkte, die zum Klonieren oder zur Transformation von *S. cerevisiae* verwendet werden sollten, unter Zuhilfenahme des QIAquick® PCR Purification Kits von Qiagen oder des PureLink™ PCR Purification Kits von Invitrogen aufgereinigt. In der Regel konnten 6-12 µg aufgereinigtes PCR-Produkt, gelöst in 30 µl H₂O_{Millipore} gewonnen werden, was einer DNA-Konzentration von 200-400 ng/µl entspricht. Bei den Reinigungen wurde nach den Protokollen der Hersteller vorgegangen. Die Qualität der Aufreinigungen wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (siehe Kap. 4.7.1).

4.7.9 Klonierung von DNA-Fragmenten

Beim Klonieren wird ein DNA-Fragment in vitro in einen Vektor integriert, der die Vervielfältigung dieser DNA in vivo und ihre molekularbiologische Nutzung ermöglicht.

Eine DNA-Klonierung besteht aus vier grundlegenden Schritten: Zunächst werden Zielvektor und DNA-Fragment, welches auch als Insert bezeichnet wird, mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten (**Schritt 1: DNA-Verdau**), sodass sie anschließend mit Hilfe des Enzyms T4-Ligase ligiert werden können (**Schritt 2: Ligation**). Der Ligationsansatz wird in *E. coli*-Bakterien transformiert, die sich vermehren und dabei die aufgenommene DNA vervielfältigen. Aufgrund eines auf dem Vektor vorhandenen Antibiotikum-Resistenzgens bilden auf antibiotikumhaltigen Agarplatten nur diejenigen Bakterienzellen eine Kolonie, die Plasmid-DNA aufgenommen haben (**Schritt 3: Transformation**). Abschließend wird nach einem *E. coli*-Klon gesucht, der das gewünschte rekombinierte DNA-Molekül enthält. Dazu wird aus mehreren Klonen die Plasmid-DNA isoliert und einer Restriktionsanalyse sowie gegebenenfalls einer Sequenzierung unterzogen. (**Schritt 4: Selektion des gewünschten *E. coli*-Klons**).

4.7.9.1 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme bakteriellen Ursprungs. Sie hydrolysieren doppelsträngige DNA an bestimmten Stellen, die sie anhand eines spezifischen Sequenzmotivs erkennen. Die in der Molekularbiologie verwendeten Typ II-Restriktionsendonukleasen spalten DNA überwiegend innerhalb ihrer definierten Erkennungssequenz, die meistens aus 4-8 palindromisch angeordneten Basen besteht. Dabei werden von den unterschiedlichen Restriktionsenzymen sowohl überhängende als auch glatte DNA-Enden (sticky bzw. blunt ends) erzeugt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Restriktionsendonukleasen zum Linearisieren zirkulärer DNA-Moleküle und zum Ausschneiden spezifischer DNA-Fragmente aus Plasmiden benutzt, die dann zum Klonieren verwendet wurden. Darüber hinaus wurden Klonierungsprodukte einer Restriktionsanalyse unterzogen, um den Erfolg der Klonierung beurteilen zu können.

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von New England BioLabs bezogen. Die Verdaue wurden in den vom Hersteller angegebenen Puffern und unter den empfohlenen Temperaturbedingungen (meist 37 °C) durchgeführt. Um nicht länger als zwei Stunden hydrolysieren zu müssen, wurden die Enzyme meistens im Überschuss eingesetzt (5-20 U pro µg DNA). Beim Klonieren wurden Vektor- und Insert-DNA in relativ großen Volumina (80-100 µl) verdaut; in der Regel wurden 3-5 µg Zielvektor sowie 5-10 µg Insert-DNA geschnitten. Zur Analyse von Klonierungsprodukten wurden ca. 500 ng DNA in 20 µl-Ansätzen hydrolysiert. Im Anschluss wurden die DNA-Proben in Agarosegelen aufgetrennt, was zum einen dazu diente, den Erfolg der Restriktion zu kontrollieren, und zum anderen ein Isolieren bestimmter DNA-Fragmente aus der Gelmatrix ermöglichte (siehe Kap. 4.7.1 und Kap. 4.7.9.3).

4.7.9.2 Dephosphorylierung von linearisierter Vektor-DNA an den 5'-Enden

Wenn für Klonierungen nur ein Restriktionsenzym verwendet wurde, wurde die geschnittene Vektor-DNA mit Alkalischer Phosphatase an den 5'-Enden dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors im Ligationsansatz zu verhindern.

Nach einer meist 20-minütigen Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme bei 65 °C wurden den Restriktionsansätzen 5 U CIP (calf intestinal alkaline phosphatase, New England BioLabs) pro µg linearisierter Vektor-DNA zugegeben, woraufhin die Ansätze nochmals 60 min lang bei 37 °C inkubiert wurden. Laut Hersteller kann die Dephosphorylierungsreaktion in allen NEB-Puffern durchgeführt werden, wobei allerdings NEBuffer 3 über optimale Bedingungen für die CIP verfügt. Da die CIP selbst nicht hitzeinaktiviert werden kann, wurde dephosphorylierte Vektor-DNA routinemäßig über ein Agarosegel aufgereinigt (s.u.).

4.7.9.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um bestimmte DNA-Fragmente aus Restriktionsverdauen isolieren zu können, wurden die Verdaue mit 5x DNA-Probenpuffer versetzt und in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt (vgl.

Kap. 4.7.1). Anschließend wurden die gewünschten DNA-Banden unter langwelligem UV-Licht ($\lambda = 366 \text{ nm}$) mit Hilfe eines sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in ein Eppendorfgefäß überführt und gewogen. Die Extraktion der DNA aus der Gelmatrix erfolgte mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kits von Qiagen gemäß dem vom Hersteller angegebenen Protokoll. Große DNA-Fragmente konnten fast immer in ausreichender Menge aufgereinigt werden (durchschnittlich $3 \mu\text{g}$ DNA in $30 \mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$), wohingegen die Ausbeute an kleinen Fragmenten oftmals sehr gering war ($c \leq 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$). Der Erfolg der Gelextraktionen wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

4.7.9.4 Ligation von DNA-Fragmenten mit der T4-DNA-Ligase

Das Enzym DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen in doppelsträngiger DNA und eignet sich somit hervorragend, um Restriktionsfragmente mit überhängenden und glatten Enden im Rahmen einer Klonierung kovalent miteinander zu verknüpfen.

Zur Ligation von aufgereinigten Restriktionsfragmenten wurde in dieser Arbeit die T4-DNA-Ligase von New England BioLabs verwendet. Meistens wurden $20 \mu\text{l}$ -Ligationsansätze hergestellt, welche neben 400 U T4-DNA-Ligase einen ATP-haltigen T4-Ligase-Puffer (New England BioLabs) in einfacher Konzentration und 100 ng geschnittene Vektor-DNA enthielten. Die Menge der einzusetzenden Insert-DNA wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Insertmasse}(\text{ng}) = \frac{\text{Vektormasse}(\text{ng}) \cdot \text{Insertlänge}(\text{kb})}{\text{Vektorlänge}(\text{kb})}$$

Bei kleinen Insertgrößen wurde ein 3-5-facher molarer Überschuss an Insert-DNA gegenüber der Vektor-DNA eingesetzt, während bei ähnlichen Fragmentgrößen gleiche Mengen an Vektor und Insert ligiert wurden. Um die Qualität der zuvor durchgeführten Restriktionsverdau beurteilen zu können, wurden zusätzlich ein Ansatz ohne Insert (Vektor-Kontrolle) sowie ein Ansatz ohne Vektor (Insert-Kontrolle) hergestellt. Die Inkubation erfolgte in H_2O bei 16°C . Unmittelbar vor der Transformation wurden die verschiedenen Ansätze 10 min auf 65°C erhitzt, um die Ligase zu inaktivieren. In der Regel wurden (wie in Kap. 4.6.2 beschrieben) $50 \mu\text{l}$ *E. coli* XL1-Blue-Zellen mit der Hälfte der Ligationsansätze transformiert.

4.7.9.5 Klonierung von PCR-Produkten mit 3'-A-Überhängen

Im Rahmen einer PCR-Klonierung werden die zu klonierenden DNA-Sequenzen in der PCR-Reaktion an beiden Enden um Restriktionsschnittstellen erweitert. Allerdings lassen sich solche Produkte wegen der endständigen Lage der Schnittstellen oftmals nur unvollständig verdauen, was bei der anschließenden Ligation mit dem Zielvektor zu einer geringen Ausbeute

führen kann. Um dies zu vermeiden, empfiehlt es sich, die PCR-Produkte zunächst unverdaut in einen sog. TA-Klonierungsvektor zwischenzuklonieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde zu diesem Zweck das TA Cloning[®] Kit von Invitrogen verwendet. Dieses macht sich eine templateunabhängige Aktivität der *Taq*-Polymerase zunutze, mit der das Enzym einzelne Desoxyadenosine (A) an die 3'-Enden seiner PCR-Produkte anhängt. Das Kit enthält einen linearisierten Vektor (pCR[®]2.1) mit 3'-Desoxythymidin (T)-Überhängen, welcher aufgrund dieser Eigenschaft äußerst effizient mit Produkten der *Taq*-Polymerase ligiert werden kann. Anschließend können die PCR-Fragmente aus den pCR[®]2.1-Konstrukten herausgeschnitten und in die eigentlichen Zielvektoren integriert werden. Bei den TA-Klonierungen wurde nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll vorgegangen. Die Hälfte der jeweiligen Ligationsansätze wurde in 50 µl kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert. Positive Klone wurden mit Hilfe des sog. Blau-weiß-Screenings (s.u.) identifiziert.

4.7.9.6 Klonierung von PCR-Produkten mit glatten Enden

Als zur Herstellung eines PCR-Fragments nicht die *Taq*-, sondern die Vent_R[®]-DNA-Polymerase verwendet wurde, konnte das Produkt nicht direkt mit dem in Kap. 4.7.9.5 beschriebenen pCR[®]2.1-Vektor ligiert werden, da die Vent_R[®]-Polymerase aufgrund ihrer 3'→5'-Exonuklease-Funktion keine 3'-A-Überhänge an PCR-Produkten zurücklässt. In diesem Fall wurden an das Produkt der Vent_R[®]-Polymerase mit der *Taq*-Polymerase 3'-A-Überhänge angefügt. Hierbei wurde nach einem Protokoll von Promega (*Promega Notes* Number 71, 1999, p.10) vorgegangen.

Zunächst wurde das mit Hilfe der Vent_R[®]-Polymerase synthetisierte PCR-Fragment unter Verwendung des QIAquick[®] PCR Purification Kits (Qiagen) aufgereinigt. Danach wurde ein 10 µl-Ansatz hergestellt, der neben 7 µl aufgereinigtem PCR-Produkt ThermoPol Reaction Buffer in einfacher Konzentration, 0,2 mM dATP und 5 U *Taq*-DNA-Polymerase (alle Komponenten von New England BioLabs) enthielt. Der Ansatz wurde 30 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl der Reaktion mit dem pCR[®]2.1-Vektor ligiert.

4.7.9.7 Blau-weiß-Screening zum Nachweis positiver Klone bei der TA-Klonierung

Der Vektor pCR[®]2.1 aus dem TA Cloning[®] Kit von Invitrogen enthält das lacZ'-Gen, welches für das α-Fragment der β-Galaktosidase kodiert. Bakterienstämme, welche dieses Gen exprimieren und gleichzeitig das ω-Fragment der β-Galaktosidase herstellen können, bilden nach Inkubation mit IPTG und X-Gal bzw. Bluo-Gal blau gefärbte Kolonien. Wurde allerdings das lacZ'-Gen durch Insertion eines PCR-Produktes unterbrochen, bleiben die Bakterienkolonien weiß. Auf diese Weise kann bei einer Klonierung zwischen positiven und negativen Klonen unterschieden werden.

E. coli XL1-Blue-Zellen sind zur Durchführung der Blau-weiß-Selektion geeignet. Daher wurden in dieser Arbeit jeweils 50 µl kompetente XL1-Blue-Bakterien mit der Hälfte der TA-Ligationsansätze transformiert und üN bei 37 °C auf LB_{Amp}-Bluo-Gal-Platten (s.u.) kultiviert. Am nächsten Tag

konnten bereits weiße von blauen Kolonien unterschieden werden, allerdings war die Blaufärbung häufig noch sehr schwach. Erst nach mehrtägiger Aufbewahrung der Platten bei 4 °C entwickelte sich ein intensives Blau, sodass die positiven weißen Klone sehr gut von den negativen unterschieden werden konnten. Um sicher zu gehen, dass die weißen Kolonien tatsächlich das gewünschte Klonierungsprodukt enthielten, wurde aus 4-6 Klonen die Plasmid-DNA isoliert (siehe Kap. 4.7.4) und einer Restriktionsanalyse sowie gegebenenfalls einer Sequenzierung unterzogen.

LB _{Amp} -Bluo-Gal-Platten	1,0 % (w/v) Bacto™ Tryptone
	0,5 % (w/v) Bacto™ Yeast Extract
	0,5 % (w/v) NaCl
	1,5 % (w/v) Bacto™ Agar
	autoklavieren, abkühlen lassen, dann Zugabe von
	100 µg/ml Amp (aus 100 mg/ml Stock-Lsg., -20 °C)
	0,5 mM IPTG (aus 1 M Stock-Lsg., -20 °C)
	100 µg/ml Bluo-Gal (fest, -20 °C, GibcoBRL)

4.7.10 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden bei MWG Biotech in Auftrag gegeben. 1 µg Plasmid-DNA (3-5 µl einer Minipräp) bzw. 20 ng/100 bp aufgereinigtes PCR-Produkt wurden üN an der Luft getrocknet und zusammen mit speziellen Sequenzierprimern (10-20 µl wässrige Lösung mit einer Konzentration von 10 pmol/µl) versendet. Standard-Sequenzierprimer wurden von MWG Biotech zur Verfügung gestellt.

4.7.11 Klonierung der verwendeten Plasmide

4.7.11.1 Klonierung der Hefepasmide pCM182-RRN3-Prot.A und pCM185-RRN3-Prot.A

Im Rahmen dieser Arbeit sollte Rrn3p unter der Kontrolle des Doxycyclin-regulierbaren TetO-Promotors exprimiert werden. Zu diesem Zweck wurde eine TEV-Prot.A-HIS₇-getagte RRN3-Sequenz in die beiden Vektoren pCM182 und pCM185 kloniert (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Enrique Herrero), die über zwei (pCM182) bzw. sieben (pCM185) aufeinanderfolgende Tet-Operator-Einheiten verfügen (Gari et al., 1997). Im Einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen:

Zur Gewinnung der TEV-Prot.A-HIS₇-getagten RRN3-Sequenz wurde eine Kolonie-PCR mit dem Hefestamm BSY420-Rrn3-Prot.A durchgeführt. In der PCR-Reaktion wurden durch Verwendung des Primerpaares RRN3-Not1-f./RRN3-Not1-r. an beide Enden des DNA-Fragments *Not* I-Schnittstellen angehängt. Das aufgereinigte PCR-Produkt (kurz: RRN3-Prot.A) wurde zunächst in einen TA-Klonierungsvektor, den pCR[®]2.1-Vektor von Invitrogen zwischenkloniert. Mehrere

positive Klone wurden zum Sequenzieren geschickt. Da die Kolonie-PCR mit der *Taq*-Polymerase durchgeführt worden war, wiesen alle sequenzierten Konstrukte mehrere Mutationen auf. Es wurde beschlossen, mit einem dieser Konstrukte weiterzuarbeiten, wobei jedoch die vorhandenen Mutationen ausgetauscht werden sollten. Dazu wurde in einem *Not* I-Verdau das RRN3-Prot.A-Fragment aus dem entsprechenden pCR[®]2.1-Konstrukt herausgeschnitten und in den mit *Not* I geöffneten Hefevektor pRS314 kloniert. Anschließend wurde der auszutauschende Bereich mittels *Afl* II-*Nde* I-Restriktion aus pRS314-RRN3_{mut}-Prot.A entfernt und durch die entsprechende WT-Sequenz ersetzt, welche aus dem Hefevektor pNOP1-RRN3-Prot.A herausgeschnitten wurde. Durch Verdau mit *Not* I wurde dann aus pRS314-RRN3_{WT}-Prot.A die WT-RRN3-Prot.A-Sequenz gewonnen und in die Vektoren pCM182 und pCM185 integriert, welche zu diesem Zweck mit *Not* I linearisiert worden waren. Abschließend wurde mit Hilfe eines *Bam*H I-Verdaus überprüft, welche der aus dieser Klonierung hervorgegangenen Konstrukte das RRN3-Prot.A-Fragment in der richtigen Orientierung enthielten.

4.7.11.2 Klonierung der Hefepasmide pNOP1-RRN3-HA₃ und pNOP1-RRN3-Δ17-HA₃

In den von Stephan Fath klonierten Hefepasmiden pNOP1-RRN3-Prot.A und pNOP1-RRN3-Δ17-Prot.A (Fath, 2002) sollte der TEV-Prot.A-HIS₇- durch einen dreifachen HA-Tag ersetzt werden. Zu diesem Zweck wurde mit 250 ng genomischer DNA aus dem Hefestamm BY4741-Rrn3-HA₃ in einer PCR-Reaktion unter Verwendung der Vent_R[®]-DNA-Polymerase (New England BioLabs) und des Primerpaares Rrn3HA-PmeI-F2/Rrn3HA-HindIII-R2 ein 900 bp langes DNA-Fragment amplifiziert, welches sich aus dem C-Terminus des RRN3-Gens und einem damit fusionierten dreifachen HA-Tag zusammensetzt. Zusätzlich wurde das Produkt über die PCR-Primer um eine N-terminale *Pme* I- und eine C-terminale *Hind* III-Restriktionsschnittstelle erweitert. Da das DNA-Fragment zu Sequenzierungszwecken in einen TA-Klonierungsvektor zwischenkloniert werden sollte, mussten zunächst mit Hilfe der *Taq*-Polymerase 3'-A-Überhänge erzeugt werden. Erst danach konnte das RRN3-HA₃-Fragment mit dem pCR[®]2.1-Vektor von Invitrogen ligiert werden. Die Sequenzierung mehrerer Klone lieferte einen Klon mit korrekter RRN3-Sequenz, welcher zur Gewinnung des RRN3-HA₃-Fragments mit *Pme* I und *Hind* III verdaut wurde. Anschließend wurde der Bereich in die Plasmide pNOP1-RRN3-Prot.A und pNOP1-RRN3-Δ17-Prot.A integriert, aus denen der entsprechende RRN3-TEV-Prot.A-HIS₇-Abschnitt ebenfalls durch *Pme* I-*Hind* III-Verdau entfernt worden war.

4.8 RNA-Techniken

4.8.1 Arbeiten mit ^3H -markierter RNA

Zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen wurden alle verwendeten Puffer und Lösungen mit frischem $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$ angesetzt und gegebenenfalls sterilfiltriert, jedoch nicht autoklaviert. Pipetten wurden vor ihrer Benutzung mit RNase Zap[®] (Ambion) gereinigt. Außerdem wurden ausschließlich gestopfte Pipettenspitzen (filter tips) verwendet. Darüber hinaus erforderte der Einsatz von Tritium-markiertem Uracil ([5, 6- ^3H]-Uracil) das Arbeiten unter einem Abzug, der speziell für Experimente mit radioaktiven Materialien ausgewiesen wurde.

4.8.2 RNA-Markierung mit [5, 6- ^3H]-Uracil (In-vivo-Pulse-Labeling)

In der vorliegenden Arbeit wurde die In-vivo-Synthese der ribosomalen RNAs (rRNAs) mit Hilfe von In-vivo-Pulse-Labeling-Experimenten untersucht: 3-5 ml der zu analysierenden Hefekulturen wurden bei einer OD_{600} von 0,8-1,0 in 15 ml-Falcongefäßen abzentrifugiert (3 min, 3000 rpm, RT). Mit der Wasserstrahlpumpe wurde das überstehende Medium bis auf 1 ml abgesaugt. Die Hefepellets wurden darin resuspendiert und in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt, welche 20 μCi [5, 6- ^3H]-Uracil (Amersham, 4 °C) enthielten. Jeder Ansatz wurde exakt 15 min unter leichtem Schütteln in einem 30 °C-Heizblock inkubiert („gepulst“). Durch eine 3-minütige Inkubation der Proben in Eiswasser wurde das Labeling abgestoppt. Anschließend wurden die Hefen pelletiert (1 min, 13.000 rpm, 4 °C) und in flüssigem Stickstoff eingefroren. In diesem Zustand können die Pellets bei -80 °C gelagert werden, meistens wurden sie jedoch sofort, wie im nächsten Kapitel beschrieben, weiterverarbeitet.

4.8.3 Reinigung der ^3H -markierten Gesamt-RNA aus *S. cerevisiae*

Zur Gewinnung der ^3H -markierten Gesamt-RNA aus Hefezellen wurde eine sog. Hot-Phenol-Extraktion durchgeführt. Bei dieser Methode werden in Acetatpuffer und 1 % SDS resuspendierte Hefen durch Mischen mit saurem Phenol und gleichzeitigem Erhitzen auf 65 °C aufgebrochen. Während Proteine und DNA dabei denaturiert werden und sich nach einem Zentrifugationsschritt zwischen der wässrigen und der organischen Phase, in der sog. Interphase ansammeln, bleibt die RNA in der wässrigen Phase zurück, aus der sie anschließend mittels Ethanol-Natriumacetat-Fällung isoliert werden kann (nach Schmitt et al., 1990). Im Einzelnen wurde wie folgt vorgegangen:

Die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen, ^3H -markierten Hefepellets wurden auf Eis aufgetaut, sodass sie in 500 μl AE-Puffer und 50 μl 10 % SDS-Lösung resuspendiert werden konnten. Nach Zugabe von 500 μl Phenol (äquilibriert in AE-Puffer) wurden die Proben gevortext und 5 min mit 1400 rpm bei 65 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Ansätze 1 min auf Eis abgekühlt und 2 min mit 14.000 rpm bei RT zentrifugiert. Die oberen wässrigen Phasen wurden vorsichtig

abgenommen und zur vollständigen Abtrennung von DNA und Proteinen nochmals mit 500 µl Phenol (äquiliert in AE-Puffer) gemischt. Im Anschluss an eine kurze Zentrifugation (30 sec., 14.000 rpm, RT) wurde aus den wässrigen Phasen durch Behandlung mit 500 µl Chloroform das restliche Phenol entfernt. Zur Gewinnung der RNA wurden die wässrigen Überstände in frische 1,5 ml-Gefäße überführt und mit 10 % (v/v) 3 M NaAc-Lösung (pH 5,3) [Endkonz. vor EtOH-Zugabe 0,3 M] und dem 2,5-fachen Volumen EtOH_{abs.} [Endkonz. 70 %] versetzt. Nach einer mehrstündigen Inkubation bei -20 °C wurden die Proben 10 min mit 13.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Die präzipitierte RNA wurde in 25 µl Solubilisierungspuffer resuspendiert, bevor sie durch 10-minütiges Erhitzen auf 65 °C denaturiert wurde. Danach wurden die RNA-Proben bei -20 °C gelagert.

3 M NaAc (pH 5,3)	pH mit Eisessig einstellen, 4 °C
AE-Puffer	50 mM NaAc (pH,5,3), 10 mM EDTA, 4 °C
Phenol (äquiliert in AE-Puffer)	Roti [®] -Aqua-Phenol (Roth, 4 °C) 3-mal mit geringer Menge AE-Puffer gut durchmischen, wässrigen Überstand jedesmal abnehmen, erneut AE-Puffer zugeben, 4 °C
Solubilisierungspuffer	8 % (v/v) Formaldehyd, 50 % (v/v) Formamid, Bromphenolblau, -20 °C

4.8.4 Messung der ³H-Inkorporation

Um den Erfolg des In-vivo-Labelings beurteilen zu können, wurden 10 % der in Solubilisierungspuffer gelösten RNA mit 1 ml Ultima Gold[™]-Szintillationsmix (Packard) gemischt. Anschließend wurden in einem Szintillationszähler (Liquid scintillation analyzer 1600 TR, Packard) 1 min lang die Zerfälle (cpm) gezählt.

4.8.5 Trennung von RNA in nativen Agarosegelen

Unterschiedliche RNA-Spezies können ebenso wie DNA-Fragmente mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt werden (siehe Kap. 4.7.1). In der vorliegenden Arbeit wurde ³H-markierte Gesamt-RNA aus der Hefe auf native Agarosegele aufgetragen, um die Qualität der RNA-Präparationen beurteilen zu können. Bei einer guten RNA-Präparation beträgt das Verhältnis von 25S-rRNA zu 18S-rRNA und tRNAs etwa 2:1:1. Darüber hinaus wurde anhand dieser Gele der RNA-Gehalt der einzelnen Proben abgeschätzt.

Zur Herstellung eines nativen RNA-Agarosegels wurden 2 g (1 %) Agarose (Electrophoresis Grade, Invitrogen) in 200 ml 1x TAE-Puffer aufgekocht. Nach Zugabe von 0,4 µg/ml Ethidiumbromid wurde das Gel im Schlitten der Elektrophoresekammer (s.u.) gegossen. Von den in 25 µl Solubilisierungspuffer gelösten RNA-Proben wurden 10 % aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in einer horizontalen Sub-Cell[®] GT-Kammer (Bio-Rad) durchgeführt, wobei 1x TAE als Kammerpuffer diente. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100 V und wurde beendet,

nachdem die Bromphenolblaufront ca. 6-8 cm ins Gel hineingelaufen war. Anschließend wurde das Ergebnis der Elektrophorese mit Hilfe des Gel Max UV-Systems von INTAS dokumentiert.

50x TAE

2 M Tris, 1 M Eisessig, 50 mM EDTA

4.8.6 Trennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen

RNA neigt dazu, unter nativen Bedingungen Sekundär- und Tertiärstrukturen auszubilden, welche durch bloßes Erhitzen nicht dauerhaft entfernt werden können und das Wanderverhalten der RNA-Spezies in der Gelelektrophorese beeinträchtigen. Um das Ergebnis eines Pulse-Labeling-Experimentes korrekt auswerten zu können, wurden die ^3H -markierten RNA-Proben daher in Gegenwart von denaturierendem Formaldehyd aufgetrennt.

Zur Herstellung eines 200 ml-Formaldehyd-Agarosegels wurden zunächst in der Mikrowelle 2,6 g (1,3 %) Agarose (Electrophoresis Grade, Invitrogen) in 170 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$ gelöst. Nachdem die Lösung auf ca. 60 °C abgekühlt war, wurden Formaldehyd-Laufpuffer in einfacher Konzentration, 2 % (v/v) Formaldehyd und 0,1 µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben. Das Gel wurde im Schlitten der Elektrophoresekammer (s.u.) gegossen, wobei auf eine möglichst waagerechte Positionierung des Gießstandes geachtet werden musste. Zur Durchführung der Elektrophorese wurde das auspolymerisierte Gel in eine horizontale Sub-Cell® GT-Kammer (Bio-Rad) gelegt, welche mit 1,5 l eines ebenfalls formaldehydhaltigen Kammerpuffers aufgefüllt wurde. Von den zu analysierenden, in Solubilisierungspuffer gelösten RNA-Proben wurden nach Möglichkeit gleiche Mengen aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte üN bei einer Spannung von 40 V und wurde erst beendet, nachdem die 18S-rRNA 10-12 cm ins Gel hineingelaufen war.

10x Formaldehyd-Laufpuffer 20 mM NaAc Trihydrat, 0,2 M MOPS, 10 mM EDTA, pH mit
2 N NaOH auf 7,0 einstellen, in dunklen Flaschen aufbewahren

Kammerpuffer 1x Formaldehyd-Laufpuffer, 2 % (v/v) Formaldehyd

4.8.7 RNA-Blotting

Zur weiteren Analyse der durch denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennten RNA-Proben wurden diese mittels Kapillarblot auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Zunächst musste allerdings das Formaldehyd aus den Gelen entfernt werden, wozu diese 5 min im 5-fachen Gelvolumen $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$ und 20 min im 5-fachen Gelvolumen 0,05 N NaOH geschwenkt wurden. Durch die Behandlung mit verdünnter Natronlauge wurde die RNA außerdem partiell hydrolysiert, was ihren Transfer auf die Nylonmembran erleichtert. Im Anschluss wurden die Gele 2-mal 20 min im 5-fachen Gelvolumen Transferpuffer (10x SSC) äquilibriert.

Die Blots wurden in der Elektrophoresekammer (Sub-Cell[®] GT cell von Bio-Rad) aufgebaut. Zunächst wurde auf den Gelschlitten eine Filterpapier-Brücke (3MM, Whatman) gelegt, deren Enden in die Pufferreservoirs der Gelkammer reichten. Darauf wurden das Gel, eine auf Gelgröße zurechtgeschnittene Membran (Nylonmembran Positive[™], Qbiogene) und zwei ebenfalls passgenaue Whatman-Papiere plazierte. Membran und Filterpapiere waren zuvor kurz in Transferpuffer äquilibriert worden. Auf diese Anordnung wurden mindestens 15 wiederverwendbare Pumping-Paper (PROTEAN xi size, 14,2 x 16,2 cm, Bio-Rad) und eine Metallplatte gelegt, welche durch ein Gewicht beschwert wurde. Abschließend wurde 1 l Transferpuffer (10x SSC) auf die beiden Pufferreservoirs verteilt. Indem der Puffer durch Kapillarkräfte über die Whatman-Papier-Brücke in die Pumping-Paper-Schicht gesaugt wurde, wurde die ³H-markierte RNA auf die darüber liegende Nylonmembran transferiert. Um eine möglichst vollständige Übertragung zu erzielen, wurde der Blot 1h durchgeführt. Im Anschluss wurden die Membranen kurz in 2x SSC inkubiert und dann zum Trocknen auf die Arbeitsfläche gelegt.

20x SSC

3 M NaCl, 0,3 M Tri-Na-Citrat Dihydrat

4.8.8 Fixierung der RNA auf der Nylonmembran

Die getrockneten Blots wurden ca. 30 sec. lang mit UV-Licht ($\lambda = 312$ nm) bestrahlt, wodurch die RNA kovalent an die Nylonmembran gekoppelt wurde. Anschließend wurden die Blots in der Gel Max-Kammer von INTAS fotografiert.

4.8.9 Detektion der ³H-markierten rRNA mittels Autoradiographie

Zur Detektion der ³H-markierten rRNA-Spezies wurde in einer lichtundurchlässigen Kassette auf die getrockneten Membranen ein Phosphorimager-Screen (Imaging Plate BAS-MS 2040, Fujifilm) aufgelegt. Nach 3-4-tägiger Exposition bei RT wurde der Screen in einem Phosphorimager (BAS 1000, Fujix, Vertrieb durch Raytest) mit Hilfe der Image Reader BAS-1000-Software (Fujifilm) ausgewertet. Quantifizierungen wurden mit dem Fujifilm-Programm Image Gauge durchgeführt.

4.8.10 Northern-Hybridisierung mit einer ³²P-markierten Oligonukleotidsonde

Einige der RNA-Blots wurden zusätzlich mit einer gegen die 25S-rRNA gerichteten ³²P-markierten Oligonukleotidsonde hybridisiert, sodass die in den einzelnen Spuren vorhandenen Gesamt-rRNA-Mengen beurteilt werden konnten. Alle hierzu notwendigen Arbeitsschritte wurden in einem Isotopenlabor durchgeführt.

Zur 5'-Markierung des in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotids o9-25S wurden $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, Amersham, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) und die T4-Polynukleotidkinase (PNK) von New England BioLabs verwendet. In einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß wurde folgender Reaktionsmix zusammenpipettiert:

6,5 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$
 1,5 μl 10x PNK-Puffer
 1,0 μl Oligonukleotid (10 pmol/ μl)
 5,0 μl (50 μCi) $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$
 1,0 μl T4-PNK

Der Ansatz wurde 45-60 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen, wurde der Mix mit 1 μl 0,5 M EDTA versetzt. Nach Zugabe von 50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$ wurde das kinasierte Oligonukleotid mit Hilfe einer Micro Bio-Spin 6-Säule (Bio-Rad) vom überschüssigen $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ abgetrennt (Durchführung der Aufreinigung gemäß den Herstellerangaben). Anschließend wurde in einem Szintillationszähler (Liquid scintillation analyzer 1600 TR, Packard) die Aktivität von 1 μl Sonde bestimmt.

Um einen RNA-Blot mit der gegen die 25S-rRNA gerichteten, ^{32}P -gelabelten Oligonukleotidsonde hybridisieren zu können, wurde die Membran in eine Hybridisierungsröhre eingeführt und mit 50 ml 2x SSC angefeuchtet. Nach Entfernung des SSC-Puffers wurde die Membran mit 12,5 ml Hybridisierungspuffer versetzt und in einem Hybridisierungssofen zunächst 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ prä-hybridisiert, bevor anschließend die Sonde vollständig dazugegeben und die Röhre üN bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ rotiert wurde. Im Anschluss an die Hybridisierung wurde der Hybridisierungsmix vorsichtig in ein 50 ml-Falcongefäß abgegossen und zur nochmaligen Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die Membran wurde in der Röhre 2-mal 15 min mit je 50 ml 2x SSC/0,1 % SDS sowie 2-mal 15 min mit je 50 ml 1x SSC/0,1 % SDS gewaschen, wobei die Inkubationen bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erfolgten und auf vorgewärmte Puffer zurückgegriffen wurde. Anschließend wurde der Blot vorsichtig aus der Hybridisierungsröhre gezogen, auf der Arbeitsfläche getrocknet und in einer lichtundurchlässigen Kassette unter einen Phosphorimager-Screen (Imaging Plate BAS-III, Fujifilm) gelegt. Nach einer mehrstündigen Exposition bei RT wurde der Screen in einem Phosphorimager (BAS 1000, Fujix, Vertrieb durch Raytest) mit Hilfe der Image Reader BAS-1000-Software (Fujifilm) ausgewertet. Quantifizierungen wurden mit dem Fujifilm-Programm Image Gauge durchgeführt.

20x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Tri-Na-Citrat Dihydrat
Hybridisierungspuffer	50 % Formamid, 5x SSC, 0,5 % (w/v) SDS, 5x Denhards
50x Denhards	10 mg/ml Ficoll (Typ400), 10 mg/ml Polyvinylpyrrolidon, 10 mg/ml BSA Fraktion V, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

4.9 Biochemische Methoden

4.9.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten (WCEs)

Zur Gewinnung von Proteinextrakten können Hefezellen sowohl mechanisch als auch enzymatisch aufgeschlossen werden. Während sich mechanische Verfahren zur Herstellung von Gesamtzellextrakten (engl.: whole cell extracts – WCEs) eignen, werden enzymatische Methoden eher bei Zellfraktionierungen angewandt (vgl. Kap. 4.9.3). Gesamtzellextrakte wurden in dieser Arbeit wie folgt hergestellt:

Zunächst wurden die Hefekulturen wie in Kap. 4.5.2 beschrieben geerntet. Die Zellpellets wurden mit eiskaltem $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$ gewaschen, auf 1,5 ml-Cups verteilt und im gleichen Volumen eiskaltem Hochsalz-Aufschlusspuffer aufgenommen. Nach Zugabe von Protease-Inhibitoren (1 mM PMSF, 2 mM Benzamidin) wurden die Hefesuspensionen bis zum Flüssigkeitspegel mit vorgekühlten Glasperlen (\varnothing 0,75-1,0 mm, Roth) aufgefüllt. Der Aufschluss erfolgte dann mit Hilfe eines Vibrax (Modell VXR basic + Eppendorfaufsatz, IKA), auf dem die Zellen bei 4 °C 45 min mit 2000-2200 rpm geschüttelt wurden. Nach Zugabe von 150-250 μl Aufschlusspuffer wurden die Proben gut gemischt und 15 min mit 13.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände, welche im Folgenden als Gesamtzellextrakte (WCEs) bezeichnet werden, wurden abgenommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Wenn die Extrakte zur Durchführung von Immunpräzipitationen und Gelfiltrationen hergestellt wurden, wurden sie vor dem Einfrieren zusätzlich für die Dauer von 40 min mit ca. 100.000 g (bzw. 38.000 rpm) in einem TFT 55.38-Kontron-Rotor zentrifugiert, der zu diesem Zweck mit speziellen Eppendorf-Adaptoren und UZ-tauglichen 1,5 ml-Cups (Microfuge Tube Polyallomer, Beckman) bestückt wurde.

Hochsalz-Aufschlusspuffer	20 % (w/v) Glycerin, 150 mM HEPES (pH 7,6), 10 mM MgCl_2 , 400 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, autoklavieren, bei 4 °C lagern; frisch 5 mM β -Mercaptoethanol zugeben
100x PMSF/Benzamidin	100 mM PMSF, 200 mM Benzamidin in $\text{EtOH}_{\text{abs.}}$, -20 °C

4.9.2 Hefe-Aufschluss unter denaturierenden Bedingungen

Um nach genomischer Integration von Affinitätstags eine große Anzahl Hefeklone mittels Western-Blot auf das Vorhandensein des gewünschten Fusionsproteins testen zu können, wurden einzelne Kolonien zeitsparend in Gegenwart von denaturierendem Harnstoff lysiert.

Eine Impföse Hefen wurde in 1 ml eiskaltem $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$ suspendiert und mit 150 μl alkalischer Vorbehandlungslösung versetzt. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden den Proben 150 μl 55 %ige TCA zugegeben. Die Ansätze wurden nochmals 10 min auf Eis inkubiert, bevor sie 10 min mit 13.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert wurden. Die Pellets wurden in 40 μl HU-Puffer aufgenommen, der sich aufgrund des sauren Milieus gelb färbte, woraufhin die Proben bis zum Farbumschlag nach blau mit Ammoniak begast wurden. Anschließend wurden die Ansätze 10 min

lang bei 65 °C geschüttelt. Durch eine 5-minütige Zentrifugation mit 13.000 rpm wurden die Zelltrümmer sedimentiert. Die Überstände wurden in frische Eppendorfgefäße überführt und bei -20 °C gelagert. Für die anschließende Western-Blot-Analyse wurden 15-20 µl Lysat verwendet.

Vorbehandlungslösung	7,5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 1,85 M NaOH
HU-Puffer	5 % (w/v) SDS, 0,2 M Tris/HCl (pH 6,8), 1 mM EDTA, 1,5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 8 M Harnstoff, Bromphenolblau, -20 °C

4.9.3 Kern-Zytoplasma-Fraktionierung

Die Verteilung bestimmter Proteine in der Hefezelle kann sowohl mit Hilfe zellbiologischer Methoden (z.B. mittels indirekter Immunfluoreszenz, Kap. 4.11) als auch biochemisch untersucht werden. Bei der biochemischen Vorgehensweise werden zunächst durch Zymolyase-Verdau Sphäroplasten erzeugt, die dann mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators aufgeschlossen werden, ohne dabei die Zellkerne zu zerstören. Anschließend werden durch Zentrifugation die Kerne vom Zytoplasma getrennt, sodass beide Fraktionen unabhängig voneinander im Western-Blot analysiert werden können (nach Rozijn und Tonino, 1964).

Sobald die zu untersuchenden Hefekulturen eine OD₆₀₀ von 0,8 erreicht hatten, wurden jeweils 12 ml Kultur abzentrifugiert (3 min, 2500 rpm, RT). Die Pellets wurden mit 5 ml 2 mM DTT gewaschen, bevor sie in 5 ml Protoplasten-Recovery-Puffer + 1 mM DTT aufgenommen und in 25 ml-Bechergläser überführt wurden. Durch Zugabe von 5 mg Zymolyase 100T (Seikagaku Corporation, 4 °C) und leichtes Schütteln (max. 150 rpm) der Suspensionen bei 30 °C für die Dauer von 20 min wurden Sphäroplasten erzeugt. Die Verdauung wurde beendet, indem die Sphäroplasten pelletiert (3 min, 2500, RT) und zur Entfernung von restlichem Enzym mit 1 ml Protoplasten-Recovery-Puffer gewaschen wurden. Danach wurden sie nochmals für die Dauer von 20 min unter leichtem Schütteln in 5 ml Protoplasten-Recovery-Puffer inkubiert. Im Anschluss wurden die Sphäroplasten bei 4 °C sedimentiert und gründlich in 0,7 ml eiskaltem PVP/Triton-Puffer resuspendiert. Nach Überführung der Suspension in einen Dounce-Homogenisator (1 ml, Wheaton/Fisher Scientific) wurden die Sphäroplasten aufgeschlossen, indem der Stößel (kleine Spaltbreite: 25-75 µm) 22-mal auf und ab bewegt und dabei um die Stößelachse gedreht wurde. Die Lysate wurden in 2 ml-Eppendorfgefäßen mit 0,7 ml eiskaltem PVP/0,6 M Saccharose-Puffer vermischt und dann in 15 ml-Falcongefäßen vorsichtig auf 3 ml eines PVP/0,45 M Saccharose-Kissens pipettiert. Durch eine 10-minütige Zentrifugation mit 4500 rpm bei 4 °C in einem Swing-out-Rotor wurden die Zellkerne vom Zytoplasma getrennt. 70 µl der Überstände, was 5 % der jeweiligen Zytoplasma-Fraktion entsprach, wurden einer Methanol/Chloroform-Fällung unterzogen (zur Durchführung siehe Kap. 4.9.5.2). Die sedimentierten Kerne wurden in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt und in 100 µl 4x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Bis zu ihrer Analyse im Western-Blot wurden sowohl die Kern- als auch die Zytoplasma-Proben bei -20 °C aufbewahrt.

Protoplasten-Recovery-Puffer für wachsende Hefen	1 % (w/v) Bacto™ Peptone 0,01 % (w/v) Bacto™ Yeast Extract 0,6 % (w/v) Malzextrakt 2 % (w/v) Glucose 17,8 mM MgAc · 4 H ₂ O _{Millipore} 12 % (w/v) Mannitol 20 min bei 120 °C autoklavieren, bei 4 °C aufbewahren
Protoplasten-Recovery-Puffer für Trp-depletierte Hefen	0,67 % (w/v) YNB+Nitrogen 0,063 % (w/v) CSM-His-Leu-Trp w/20 mg/l Ade 2 % (w/v) Glucose 20 mg/l Histidin, 100 mg/ml Leucin 17,8 mM MgAc · 4 H ₂ O _{Millipore} 12 % (w/v) Mannitol 20 min bei 120 °C autoklavieren, bei 4 °C aufbewahren
PVP-Puffer	8 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon (M ≈ 40.000 g/mol), 1 mM MgCl ₂ , 20 mM K-Phosphat-Puffer (pH 6,5), -20 °C
PVP-Triton-Puffer	0,03 % (w/v) Triton® X-100 in PVP-Puffer, -20 °C, zum Auftauen erwärmen, vor Gebrauch auf 4 °C bringen
PVP/0,6 M Saccharose	0,6 M Saccharose in PVP-Puffer, -20 °C, zum Auftauen erwärmen, vor Gebrauch auf 4 °C bringen
PVP/0,45 M Saccharose	0,45 M Saccharose in PVP-Puffer, -20 °C, zum Auftauen erwärmen, vor Gebrauch auf 4 °C bringen

4.9.4 Proteinbestimmung nach Bradford

In der vorliegenden Arbeit wurde die Proteinkonzentration von Gesamtzellextrakten mit Hilfe des Bradford-Assays bestimmt (Bradford, 1976). Die Methode basiert auf der Beobachtung, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren Coomassie Brilliant Blue G-250-Lösung von 465 nach 595 nm verschiebt, wenn der Farbstoff an vorhandenes Protein bindet. Die entstehenden Farbstoff-Protein-Komplexe sind demnach blau gefärbt, wobei die Intensität der Blaufärbung von der Proteinmenge in der jeweiligen Probe abhängt. Nach Messung der Absorptionen bei 595 nm wird zur Berechnung der Proteinkonzentrationen eine Eichkurve herangezogen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Durchführung des Bradford-Tests der Bio-Rad Protein-Assay verwendet. 1-2 µl der zu bestimmenden Proteinextrakte wurden in 1 ml-Kunststoffküvetten mit 800 µl H₂O_{Millipore} sowie 200 µl Bio-Rad-Reagenz vermischt. Die Absorptionsmessungen erfolgten nach 5 min in einem Ultrospec 3100 pro-Photometer (Amersham Biosciences) bei einer Wellenlänge von 596 nm. Zur Berechnung der Proteinkonzentrationen wurden die durch das Probenvolumen dividierten Absorptionen mit 23 multipliziert. Dieser Faktor ergab sich aus einer Eichgeraden, die mit BSA-Lösungen bekannter Konzentrationen erstellt wurde.

4.9.5 Fällung von Proteinen

Durch Fällung können Proteine konzentriert und gleichzeitig von Salzen befreit werden. Meistens werden Säuren oder organische Lösungsmittel verwendet, um Proteine zu präzipitieren.

4.9.5.1 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)

Die Proteinlösungen wurden auf Eis mit 1/5 Volumen eiskalter Trichloressigsäure (TCA) versetzt [Endkonz. $\approx 16\%$]. Außerdem wurden durch Zugabe von 2 μl 2 % (w/v) DOC-Lösung Kristallisationskeime zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die ausgefallenen Proteine durch eine 15-minütige Zentrifugation mit 13.000 rpm bei 4 °C sedimentiert. Die Proteinpellets wurden mit eiskalter 10 %iger TCA gewaschen, nochmals kurz zentrifugiert (5 min, 13.000 rpm, 4 °C) und dann in 20 μl 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Da sich dieser aufgrund des sauren Milieus gelb färbte, wurden die Proben bis zum Farbumschlag mit Ammoniak begast, bevor sie bei -20 °C gelagert wurden.

4.9.5.2 Protein-Fällung mit Methanol/Chloroform

Die zu analysierenden Proteinlösungen wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$ auf ein Volumen von 150 μl gebracht, bevor sie nacheinander mit 600 μl Methanol p.A., 150 μl Chloroform p.A. und 450 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$ versetzt wurden. Nach jeder einzelnen Zugabe wurden die Proben gut gevortext. Anschließend wurden die Ansätze zentrifugiert (5 min, 13.000 rpm), sodass sich die ausgefällten Proteine zwischen der unteren organischen und der oberen wässrigen Phase anordnen konnten. Nach Abnahme der oberen Phasen wurden nochmals 450 μl Methanol p.A. zugegeben und durch Vortexen mit den Proben vermischt. Durch eine erneute Zentrifugation (10 min, 13.000 rpm) wurden die Proteine schließlich sedimentiert. Die Pellets wurden 10 min in der Speed-Vac (Savant) getrocknet, bevor sie in 20 μl 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert und bei -20 °C gelagert wurden.

4.9.6 Western-Blot

Der Western-Blot ermöglicht die Identifizierung und Quantifizierung spezifischer Proteine innerhalb eines Proteingemischs. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Western-Blots folgendermaßen durchgeführt: Zunächst wurden die Proteinlösungen einer SDS-PAGE unterzogen. Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden dann durch Elektrottransfer auf eine PVDF-Membran übertragen. Anschließend wurden die jeweiligen Proteine mittels Immunfärbung auf der Membran nachgewiesen.

4.9.6.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) wurde zum Auftrennen von Proteingemischen entwickelt. Gele, Proben- und Kammerpuffer enthalten hierbei das anionische Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat), welches Proteine denaturiert und Protein-Protein-Interaktionen zerstört, indem es an die Hauptketten der Proteine bindet und dabei die nicht-kovalenten Wechselwirkungen aufhebt. Gleichzeitig werden durch im Probenpuffer enthaltene Thiole wie β -Mercaptoethanol oder DTT die Disulfidbrücken reduziert, sodass die Polypeptidketten in eine lineare Form übergehen. Ein mit SDS-Anionen beladenes Protein besitzt einen hohen Überschuss an negativer Ladung, die die ursprüngliche Ladung des nativen Proteins überdeckt. Sie ist der Masse des Proteins ungefähr proportional, da pro Gramm Protein 1,4 g SDS gebunden werden. Aufgrund dieses konstanten Verhältnisses von Ladung zu Masse unterscheiden sich mit SDS-Anionen beladene Proteine nicht mehr durch ihre Ladung, sondern nur noch hinsichtlich ihres Molekulargewichts voneinander. Folglich bewegen sich bei der SDS-PAGE alle Proteine entsprechend ihrer negativen Ladung zur Anode, wobei kleine Polypeptidketten aufgrund des Siebeffekts der Polyacrylamidmatrix schneller durch das Gel wandern als große.

Von den verschiedenen SDS-PAGE-Systemen wird das diskontinuierliche Lämmli-System am häufigsten verwendet (Laemmli, 1970). Hierbei überschichtet ein weitporiges Sammelgel (3-5 % Acrylamid in 0,125 M Tris/HCl, pH 6,8) ein engmaschiges Trenngel (6-20 % Acrylamid in 0,375 M Tris/HCl, pH 8,8). Bei der Elektrophorese treten die Proteine zunächst ins Sammelgel ein, wo sie zu einer scharfen Bande fokussiert werden; folglich erreichen alle Proteine nahezu gleichzeitig das Trenngel. Beim Eintritt ins Trenngel geht der Sammeleffekt verloren, sodass die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden können. Der Acrylamid-Gehalt der Gele richtet sich nach dem Molekulargewicht der aufzutrennenden Polypeptide. In der vorliegenden Arbeit kamen SDS-Gele mit einer Acrylamid-Konzentration von 8 bzw. 10 % im Trenngel und 3,9 % im Sammelgel zum Einsatz, wobei das Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylenbisacrylamid, welches die Quervernetzung der Acrylamidketten bedingt, bei 37,5:1 lag. In Abhängigkeit von Probenanzahl und -volumen wurden entweder Mini-Gele mit 10 bzw. 15 Taschen oder Breitformat-Gele mit 25 bzw. 36 Taschen verwendet. Zur Herstellung von Trenn- und Sammelgel wurde die entsprechende Menge Acrylamid-Stammlösung (Rotiphorese[®] Gel 30 (37,5:1), Roth, 4 °C) mit Trenn- bzw. Sammelgelpuffer in einfacher Konzentration vermischt. Anschließend wurden 0,08 bzw. 0,12 % (w/v) APS, um die Polymerisation zu starten, und 0,1 % (v/v) TEMED als Katalysator zugegeben. Die Gele wurden in den jeweiligen Gelgießständen zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch 0,75 mm- (Minigele) bzw. 0,8 mm-Spacer (Breitformat-Gele) voneinander getrennt wurden.

Unmittelbar vor Durchführung einer SDS-PAGE wurden die aufzutrennenden Gesamtzellextrakte (meist 30 μ g Gesamtprotein) mit H₂O_{Millipore} auf eine Gesamtvolumen von ungefähr 15 μ l gebracht, mit 5 μ l 4x SDS-Probenpuffer versetzt und 5-10 min auf 95 °C erhitzt. Bereits in Probenpuffer resuspendierte und bei -20 °C gelagerte Proteinproben wurden vor dem Auftragen ebenfalls hitzedenaturiert. Die polymerisierten Gele wurden in die entsprechende Elektrophorese-Apparatur

(Mini-PROTEAN[®] 3 electrophoresis cell von Bio-Rad bzw. PerfectBlue[™] Breitformat-Doppelgelsystem Twin ExW S von PeqLab) eingespannt, woraufhin diese mit 1x Elektrophoresepuffer befüllt wurde. Anschließend wurden die Proben und ein Molekulargewichtsmarker (Prestained broad range molecular weight marker, -20 °C, New England BioLabs) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 25 mA pro Minigel bzw. 50 mA pro Breitformat-Gel durchgeführt, wobei die Spannung auf 180 V begrenzt wurde. Nachdem die Bromphenolblaufront den unteren Rand der Gele erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert.

4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, 0,4 % (w/v) SDS (pH 8,8), 4 °C
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, 0,4 % (w/v) SDS (pH 6,8), 4 °C
APS-Stocklösung	10 % (w/v) APS in H ₂ O _{Millipore} , 4 °C
4x SDS-Probenpuffer	40 % (w/v) Glycerin, 0,25 M Tris/HCl (pH 6,8), 8,4 % (w/v) SDS, 0,57 M β -Mercaptoethanol, Bromphenolblau, -20 °C
10x Elektrophoresepuffer	0,25 M Tris, 1,9 M Glycin, 1 % (w/v) SDS

4.9.6.2 Elektroblotting

Beim Elektroblotting werden die in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes auf eine Membran aus Nitrocellulose oder PVDF (Polyvinylidendifluorid) transferiert und dort immobilisiert. In dieser Arbeit wurde für den Transfer eine horizontale Semi-Dry-Blot-Apparatur (Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad) verwendet, die mit einer relativ geringen Menge Transferpuffer auskommt. Auf die als Anode fungierende untere Elektrodenplatte wurden zunächst drei in Transferpuffer getränkte, auf Gelgröße zurecht geschnittene Filterpapiere (3MM, Whatman) gelegt. Darauf wurden luftblasenfrei eine passgenaue PVDF-Membran (Immobilon[™]-P, Millipore, Porengröße: 0,45 μ m) und das in Transferpuffer äquilibrierte Gel plziert. Drei weitere in Transferpuffer getränkte Filterpapiere schlossen den Aufbau ab. Die PVDF-Membran musste unmittelbar vor ihrer Anwendung kurz in Methanol geschwenkt werden, bevor sie ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert wurde. Nach Auflegen der oberen Elektrodenplatte wurde für 60-70 min eine Spannung von 24 V angelegt, wodurch die negativ geladenen Proteine aus dem SDS-Gel auf die Membran übertragen wurden.

Transferpuffer	20 % (v/v) Methanol, 47,8 mM Tris, 38,6 mM Glycin, 0,037 % (w/v) SDS
----------------	--

4.9.6.3 Nachweis membrangebundener Proteine mittels Ponceau S-Färbung

Um beim Western-Blot Qualität und Quantität des Proteintransfers kontrollieren zu können, wurden die auf eine PVDF-Membran transferierten Proteine mit Ponceau S reversibel angefärbt. Zu diesem Zweck wurde die Membran zunächst mehrere Minuten in Ponceau S-Färbelösung geschwenkt. Die

dadurch vollständig rot gefärbte Membran wurde anschließend so lange mit Wasser gewaschen, bis einzelne Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Beim anschließenden Blocking wurden auch die Proteine wieder entfärbt.

Ponceau S-Färbelösung	0,5 % (w/v) Ponceau S in 1 % (v/v) Essigsäure
-----------------------	---

4.9.6.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen im Western-Blot

Die im Rahmen von Western-Blot-Analysen durchgeführte Immunfärbung diente dazu, unter den auf einer PVDF-Membran immobilisierten Proteinen bestimmte Proteine spezifisch nachzuweisen. Meistens wurde ein indirektes Zwei-Schritt-Verfahren angewandt, bei dem ein speziesspezifischer, enzymgelabelter Sekundär-Antikörper an einen antigenspezifischen Primär-Antikörper bindet. Zunächst wurden die Blots allerdings 1-2 h in magermilchpulverhaltiger Blocking-Lösung geschwenkt. Das darin enthaltene Casein soll proteinfreie Membranbereiche absättigen, damit es im weiteren Verlauf der Immunfärbung nicht zu unspezifischer Antikörper-Bindung kommt. Anschließend wurden die Blots 1,5-2 h mit einem Primär-Antikörper inkubiert, der spezifisch an das nachzuweisende Protein bindet. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurden die Membranen danach zweimal 10 min mit PBST gewaschen. Anschließend erfolgte eine 40-minütige Inkubation mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper, welcher den F_C-Teil des eingesetzten Primär-Antikörpers erkennt. Danach wurden die Membranen erneut zweimal 10 min mit PBST gewaschen. Ferner wurden zum Nachweis von Protein A- und TAP-getagten Proteinen Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP)-Komplexe verwendet, die über die F_C-Domänen der beteiligten Antikörper an Protein A binden. Für alle Antikörper-Inkubationen wurden die Membranen mit 5-10 ml der jeweiligen Antikörper-Verdünnung (Antikörper in 5 % (w/v) Milchpulver in PBST) in Kunststoff-Folien eingeschweißt und auf einem Überkopf-Rotator inkubiert.

Zur Visualisierung der Immunkomplexe wurde das BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) von Roche verwendet. Hierzu wurden die Blots 1 min mit einer gemäß den Herstellerangaben angesetzten Detektionslösung überschichtet, welche das Substrat Luminol enthält. Dieses wird von der an die Sekundär-Antikörper gebundenen Peroxidase zu einem lumineszierenden Produkt umgesetzt. Die dabei emittierte Strahlung kann mit einem Röntgen-Film oder einer CCD-Kamera nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Signale mit Hilfe eines CCD-Imaging Systems, dem Chemilumineszenz-Imager LAS-3000 von Fujifilm (Vertrieb durch Raytest) detektiert, welcher mit der Image Reader LAS-3000-Software (Version 1.12) von Fujifilm arbeitet. Quantifizierungen wurden mit dem Raytest-Programm AIDA V3.20 bzw. V4.03 durchgeführt.

10x PBS	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 14 mM KH ₂ PO ₄ , 43 mM Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O (pH 7,4)
---------	---

Blocking-Lösung	5 % (w/v) Magermilchpulver in 1x PBS
PBST	0,05 % (v/v) Tween 20 in 1x PBS

4.9.6.5 Verwendete Antikörper

Tab. 4.5: In Western-Blot-Analysen eingesetzte Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Aufbewahrung	Herkunft
α -A43	Kaninchen	1:5000-1:20.000	-20 °C, mehrfach verwendbar	A. Sentenac, Paris (Buhler et al., 1980)
α -A135	Kaninchen	1:30.000	-20 °C, mehrfach verwendbar	A. Sentenac, Paris (Buhler et al., 1980)
α -PGK (Phosphoglycerat-kinase)	Maus	1:2000	-20 °C, mehrfach verwendbar	Molecular Probes
α -Nop1	Maus	1:1000	-20 °C, mehrfach verwendbar	?
α -HA (12CA5)	Maus	1:2000	-20 °C	E. Kremmer, München
α -HA (16B12)	Maus	1:1000-1:2000	-20 °C	BabCO/Hiss Diagnostics
α -HA High Affinity (3F10, 100 µg/ml)	Ratte	1:2000	-20 °C	Roche Diagnostics
PAP	Kaninchen	1:5000-1:10.000	4 °C	DakoCytomation
Goat- α -rabbit IgG (H+L)-POD [111-035-144]	Ziege	1:10.000	-20 °C, 1:1 mit Glycerin verdünnt	Jackson IR/Dianova
Goat- α -mouse IgG (H+L)-POD [115-035-146]	Ziege	1:20.000	-20 °C, 1:1 mit Glycerin verdünnt	Jackson IR/Dianova
Goat- α -rat IgG+IgM (H+L)-POD [112-035-068]	Ziege	1:6000	-20 °C, 1:1 mit Glycerin verdünnt	Jackson IR/Dianova

4.9.7 Gelfiltrationschromatographie

Bei der Gelfiltrations- oder Größenausschlusschromatographie werden gelöste Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt (Porath und Flodin, 1959). Das Trennmateriale besteht aus porösen Partikeln mit definierter Porengröße. Während große Moleküle nicht in die Poren der Trennmatrix eindringen können und daher im Ausschlussvolumen eluieren, bewegen sich kleinere Komponenten zwischen den Partikeln der stationären Phase und dringen in ihre Poren ein. Folglich brauchen kleine Moleküle länger, um durch die Matrix einer Gelfiltrationssäule zu wandern und werden später eluiert als größere Komponenten. Die Wahl des Säulenmaterials richtet sich nach dem Molekulargewicht der aufzutrennenden Probenbestandteile. Gewöhnlich wird die Gelfiltrationschromatographie angewandt, um Proteingemische zu fraktionieren; daneben kann sie aber auch zum

Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt werden, da interagierende Proteine von der Gelfiltrationssäule koeluieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Superose® 6 HR 10/30-Säule von Amersham Biosciences verwendet, um Hefe-Gesamtzellextrakte zu analysieren (zur WCE-Herstellung siehe Kap. 4.9.1). Bei der Superose 6-Matrix handelt es sich um vernetzte Agarose mit einem Partikeldurchmesser von 11-15 µm und einem Trennbereich von 5-5000 kDa. Die Gelfiltrationen wurden in einer FPLC® (Fast Protein Liquid Chromatographie)-Anlage von Pharmacia Biotech durchgeführt. Zunächst wurde die in 20 % (v/v) EtOH aufbewahrte Säule mit H₂O_{Millipore} und Hochsalz-Laufpuffer äquilibriert, bevor über einen 200 µl-Loop 900 µg WCE geladen und in Hochsalz-Laufpuffer aufgetrennt wurden, wobei eine Flussrate von 0,35 ml/min gewählt und der Druck auf 1,5 MPa begrenzt wurde. Mit Hilfe eines FRAC-100 Fraktionenkollektors (Pharmacia Biotech) wurden ca. 45 Fraktionen à 500 µl gesammelt. Alle Lösungen und Puffer wurden vor ihrer Verwendung filtriert und entgast. Die aufzutrennenden Gesamtzellextrakte wurden unmittelbar vor dem Auftragen nochmals abzentrifugiert (5 min, 13.000 rpm, 4 °C), um eventuell vorhandenes Präzipitat zu entfernen. Beginnend mit Fraktion 16 wurden bis zu Fraktion 38 50 % jeder zweiten Fraktion TCA-gefällt (siehe Kap. 4.9.5.1), in 20 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und bis zu ihrer Analyse im Western-Blot bei -20 °C aufbewahrt.

Hochsalz-Laufpuffer	10 % (w/v) Glycerin, 20 mM HEPES (pH 7,8), 2 mM MgCl ₂ , 0,02 mM EDTA, 1,5 M KAc, 0,05 % (v/v) Tween 20, frisch 5 mM β-Mercaptoethanol und 1 mM PMSF/2 mM Benzamidin zusetzen, filtrieren und entgasen, auf 4 °C bringen
---------------------	--

4.9.8 Immunpräzipitationen (IPs)

Bei der Immunpräzipitation (IP) handelt es sich um eine Form der Affinitätschromatographie, bei der eine bestimmte Komponente eines Proteingemischs mit Hilfe eines spezifischen, matrixgebundenen Antikörpers angereichert bzw. präzipitiert wird. Da hierbei mit dem Zielprotein assoziierte Proteine mitangereichert werden können, ermöglichen Immunpräzipitationen den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. In diesem Fall wird die Methode als Koimmunpräzipitation (Co-IP) bezeichnet.

4.9.8.1 Immunpräzipitation von Rrn3p aus wachsenden und stationären Hefezellen

Zur Anreicherung von Rrn3p aus Gesamtzellextrakten (WCEs) wachsender und stationärer Hefen wurde der Stamm BY4741-Rrn3-HA₃ verwendet, an dessen endogenes RRN3-Gen C-terminal ein 3-facher HA-Tag fusioniert wurde (zur Herstellung des Stammes siehe Kap. 4.5.14.1). Als Antikörper kamen ein gegen das HA-Epitop gerichteter monoklonaler Antikörper aus der Ratte (3F10, 100 µg/ml, Roche Diagnostics, -20 °C) sowie α-Rrn3p-NT, ein Rrn3p-spezifischer

Kaninchen-Antikörper (Milkereit, 1999, -80 °C), zum Einsatz. Jeweils 10 µl α-HA 3F10 bzw. 50 µl α-Rrn3p-NT wurden durch eine 60-minütige Inkubation auf Eis an ca. 40 µl Protein G-Sepharose 4 Fast Flow (Amersham, 4 °C) gebunden, die zuvor 3-mal mit 20 mM HEPES (pH 7,8) gewaschen worden war. Antikörper aus verschiedenen Spezies binden mit ihren F_C-Domänen an Protein G ebenso wie an Protein A, wobei allerdings monoklonale Ratte-Antikörper eine weitaus höhere Affinität zu Protein G besitzen, während Maus- und Kaninchen-Antikörper an beide Proteine etwa gleich gut binden. Ansätze ohne Antikörper dienten als Negativ-Kontrollen.

Die im Folgenden beschriebenen, von Fath et al. (2001) entwickelten, teilweise sehr stringenten IP-Bedingungen verhindern bzw. minimieren unspezifische Proteinwechselwirkungen mit der Affinitätsmatrix, beeinträchtigen jedoch nicht die Interaktion der RNA-Polymerase I-Untereinheiten sowie den Pol I-Rrn3p-Komplex (siehe Kap. 4.9.8.2). Zunächst wurden die zu analysierenden Gesamtzellextrakte nochmals zentrifugiert (5 min, 13.000 rpm, 4 °C), um eventuell vorhandenes Sediment zu entfernen. Anschließend wurden 2 mg WCE von wachsenden bzw. 20 mg WCE von stationären Hefen auf 900 mM KAc, 0,5 % (v/v) Nonidet P40 und 0,05 % (v/v) Triton X-100 eingestellt und mit Hochsalz-Aufschlusspuffer (ohne β-Mercaptoethanol und Protease-Inhibitoren) auf ein Gesamtvolumen von 1200 µl gebracht. Die Immunpräzipitationen und nachfolgenden Waschschrte wurden dann im Batch-Verfahren durchgeführt. Dazu wurden die Ansätze in 1,5 ml-Eppendorfgefäßen mit den jeweiligen Antikörper-Affinitätsmatrices vermischt und bei 4 °C für 2 h auf einem Drehrad inkubiert. Im Anschluss wurden die Präzipitate abzentrifugiert (1 min, 8000 rpm, 4 °C) und die Überstände mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Danach wurden die Präzipitate mit drei verschiedenen Puffern gewaschen, zunächst einmal mit TST-Puffer (IP-Waschpuffer I), dann dreimal mit IP-Waschpuffer II sowie dreimal mit IP-Waschpuffer III und abschließend noch einmal mit TST-Puffer. Dabei wurden die Präzipitate jedes Mal mit 1 ml vorgekühltem Puffer versetzt, kräftig geschüttelt, abzentrifugiert und die Überstände vorsichtig abgesaugt. Im Anschluss an einen letzten Waschschrte mit 20 mM HEPES (pH 7,8), welcher der Entfernung von Salzen und Detergenzien diente, wurden die Präzipitate mit einer Kapillarspitze trockengesaugt. Durch Zugabe von 25 µl 4x SDS-Probenpuffer wurde das präzipitierte Rrn3p von der Affinitätsmatrix eluiert. Bis zur Western-Blot-Analyse wurden die IPs bei -20 °C aufbewahrt. Vor Durchführung der SDS-PAGE wurden die IPs zunächst 5 min auf 95 °C erhitzt. Dann wurde die Protein G-Sepharose abzentrifugiert (1 min, 13.000 rpm). Die Überstände wurden großzügig abgenommen und zur Abtrennung restlicher Protein G-Beads durch gestopfte 100 µl-Pipettenspitzen in frische Eppendorfgefäße zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände vollständig auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

TST-Puffer	50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Triton X-100, bei 4 °C aufbewahren, frisch 1 mM PMSF/2 mM Benzamidin zugeben
IP-Waschpuffer II	5 mM NH ₄ Ac (pH 5,0)
IP-Waschpuffer III	1,5 M KAc, 0,5 % (v/v) Nonidet P40

4.9.8.2 Nachweis der RNA-Polymerase I-Rrn3p-Interaktion durch Koimmunpräzipitationen (Co-IPs)

Zur Charakterisierung der Pol I-Rrn3p-Interaktion wurden Hefestämme verwendet, in denen entweder die Pol I-Untereinheit A43 oder der Transkriptionsfaktor Rrn3p einen C-terminalen TAP- bzw. Protein A-Tag aufweist. Ungetagte Stämme mit ansonst identischem Genotyp dienten als Hintergrund-Kontrollen. Die zur Anreicherung der Pol I-Rrn3p-Komplexe verwendete IgG-Sepharose 6 Fast Flow (Amersham, 4 °C) präzipitiert TAP- bzw. Protein A-getagte Proteine mittels humaner IgG-Antikörper, welche kovalent an eine Sepharose-Matrix gekoppelt sind. Da der Pol I-Rrn3p-Komplex über eine hohe Stabilität verfügt, konnten die Präzipitationen unter den gleichen stringenten Bedingungen durchgeführt werden, die bereits zur Anreicherung des Rrn3p aus wachsenden und stationären Hefen zur Anwendung kamen (vgl. Kap. 4.9.8.1). Anschließend wurden die Co-IPs einer Western-Blot-Analyse unterzogen, wobei sowohl die TAP- bzw. Prot. A-getagten Zielproteine als auch die jeweiligen Interaktionspartner mit Hilfe spezifischer Antikörper sichtbar gemacht wurden.

Zur Präzipitation der TAP-getagten Pol I-Untereinheit A43 wurden 1,5 mg WCE eingesetzt, während Protein A-getagtes Rrn3p aus 6 mg WCE angereichert wurde. Im Unterschied zu dem in Kap. 4.9.8.1 beschriebenen Protokoll wurden die Gesamtzellextrakte auf 750 mM KAc/ 0,5 % NP40/0,05 % TX100 eingestellt, bevor sie mit 50 µl IgG-Sepharose 2 h bei 4 °C inkubiert wurden. Die Polymerase-Präzipitate wurden mit 30-40 µl 4x SDS-Probenpuffer eluiert, wovon die Hälfte im Western-Blot analysiert wurde. Im Gegensatz dazu wurde präzipitiertes Rrn3p-Prot.A in 20-30 µl 4x SDS-Probenpuffer aufgenommen und vollständig der SDS-PAGE unterzogen. Zusätzlich zu den Co-IPs wurden auch die Inputs (jeweils 25 bzw. 30 µg WCE) in den jeweiligen Western-Blots ausgewertet.

4.9.8.3 Crosslinking der IgG-Sepharose mit DMP

Immunpräzipitierte Proteine wurden in dieser Arbeit mit SDS-Probenpuffer eluiert (vgl. Kap. 4.9.8.1 und 4.9.8.2). Unter Einwirkung der Pufferkomponenten SDS und β -Mercaptoethanol würden sich hierbei gleichzeitig große Mengen denaturierte Antikörper von der Affinitätsmatrix lösen. Da die schweren und leichten Ketten der Antikörper in der Western-Blot-Analyse zu Auftrennungs- und Detektionsproblemen führen können, wurde die zur Anreicherung des Pol I-Rrn3p-Komplexes verwendete IgG-Sepharose vor Durchführung der Co-IPs mit Dimethylpimelimidat (DMP, Sigma, -20 °C) gecrosslinkt. DMP koppelt IgG-Moleküle über freie Aminogruppen an feste Phasen.

Zunächst wurde die benötigte Menge IgG-Sepharose zweimal mit dem 10-fachen Volumen 20 mM HEPES (pH 7,8) gewaschen. Im Anschluss an zwei weitere Waschschrte mit dem 10-fachen Volumen 0,2 M Na-Borat (pH 9,0) wurde die Sepharose mit 20 mM DMP, gelöst im 10-fachen Volumen 0,2 M Na-Borat (pH 9,0), versetzt und 30 min bei RT auf einem Überkopf-Rotator inkubiert. Die anschließende Behandlung mit 0,2 M Ethanolamin (pH 8,0) diente der Entfernung

überschüssigen Crosslinkers und der Absättigung letzter freier reaktiver Gruppen. Zunächst wurde die gecrosslinkte Affinitätsmatrix mit der Ethanolamin-Lösung gewaschen, bevor nochmals das 10-fache Volumen zugegeben und 2 h bei RT auf einem Überkopf-Rotator inkubiert wurde. Nach drei Waschschritten mit PBS (pH 7,4) konnte die gecrosslinkte IgG-Sepharose für Immunpräzipitationen verwendet werden.

4.10 Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP-Assays)

Eine Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) ermöglicht es festzustellen, ob in vivo ein bestimmtes Protein mit einer bestimmten DNA-Sequenz assoziiert ist. Die Methode wurde in den 90er Jahren u.a. von Hecht und Grunstein entwickelt und umfasst die folgenden grundlegenden Schritte: Zunächst werden die zu analysierenden Hefekulturen gecrosslinkt. In der Regel wird hierzu Formaldehyd verwendet, welches die Chromatinkomponenten (chromosomale DNA und assoziierte Proteine) über freie Aminogruppen vernetzt. Bei der anschließenden mechanischen Lyse der Zellen wird die chromosomale DNA zwar bereits grob fragmentiert, doch die hierbei entstehenden ca. 20 kb langen Fragmente gestatten es beispielsweise nicht, nahe beieinander liegende Regionen zu analysieren. Daher wird in einem nächsten Schritt die DNA durch Ultraschallbehandlung weiter fragmentiert. Im Anschluss werden aus den Chromatinextrakten ein bestimmtes Protein und die mit ihm assoziierten DNA-Bereiche immunpräzipitiert. Nach Aufhebung des Crosslinks werden die Proben einem Proteinase K-Verdau unterzogen, sodass die angereicherten DNA-Fragmente extrahiert und als Template in einer PCR-Analyse eingesetzt werden können. Wird hierbei unter Verwendung sequenzspezifischer Primer eine bestimmte DNA-Region stärker amplifiziert als andere DNA-Bereiche (= interne Kontrollen), kann daraus geschlossen werden, dass diese Region mit dem präzipitierten Protein in vivo direkt oder indirekt interagiert (Hecht und Grunstein, 1999).

4.10.1 Crosslinking und Ernte der Hefekulturen

Sobald die zu analysierenden Hefekulturen eine OD₆₀₀ von 0,8-1,0 erreicht hatten, wurden 45 ml Kultur mit 1,25 ml 37 % Formaldehyd (Endkonz.: 1 % (v/v)) versetzt und für weitere 30 min bei 30 °C inkubiert. Durch Zugabe von 125 mM Glycin wurde die Crosslinking-Reaktion gestoppt. Anschließend wurden die Hefen zweimal mit 45 ml PBS gewaschen und in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt.

4.10.2 Zellaufschluss und Ultraschallbehandlung

Die Hefepellets wurden im gleichen Volumen eiskaltem Lysepuffer resuspendiert und mit Protease-Inhibitoren (1 mM PMSF/2 mM Benzamidin) versetzt. Anschließend wurden die Hefesuspensionen bis zum Flüssigkeitspegel mit vorgekühlten Glasperlen (Ø 0,75-1,0 mm, Roth) aufgefüllt. Der

Aufschluss erfolgte dann mit Hilfe eines Vibrax (Modell VXR basic + Eppendorfaufsatz, IKA), auf dem die Zellen bei 4 °C 45 min mit 2000-2200 rpm geschüttelt wurden. Zur Gewinnung der Zellextrakte wurden die Cups in Boden und Deckel mit einer glühenden Kanüle (1,10 x 50 mm, B. Braun) durchstoßen, in 15 ml-Falcongefäße gehängt und 2 min mit 2000 rpm bei 4 °C zentrifugiert.

Vor der Ultraschallbehandlung wurde das Volumen der in den 15 ml-Gefäßen gesammelten Zellextrakte zunächst mit eiskaltem Lysepuffer auf ca. 800 µl erhöht. Dann wurden die Gefäße mit Hilfe eines Stativs in einem Branson Sonifier 250 fixiert. Wenn mit einer Chromatin-IP nahe beieinander liegende DNA-Regionen untersucht werden sollen, hängt der Erfolg des Experiments wesentlich davon ab, dass bei der Ultraschallbehandlung möglichst kleine DNA-Fragmente erzeugt werden. Je länger die Proben dem Ultraschall ausgesetzt werden, desto kürzer werden im Durchschnitt die Fragmente. Bei den in dieser Doktorarbeit durchgeführten ChIP-Experimenten sollten DNA-Fragmente mit einer Länge von 500-1000 bp erzeugt werden, wozu folgende Sonifier-Einstellungen gewählt wurden: Output Control: 3, Timer: Hold, Duty Cycle: knapp unter Constant, 4 Ultraschall-Zyklen (10 Pulse/Zyklus). Während der Behandlung und zwischen den vier Ultraschall-Zyklen wurden die Proben in Eiswasser gekühlt. Nach der Ultraschallbehandlung wurden die Suspensionen in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt und zur Entfernung der Zelltrümmer 20 min mit 13.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und entweder vorübergehend bei -80 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

4.10.3 Immunpräzipitation

Vor Durchführung der Immunpräzipitationen wurden von den Chromatinextrakten 40 µl abgenommen und in 500 µl-Eppendorfgefäßen mit 80 µl TE/1 % (w/v) SDS versetzt. Diese als INPUT bezeichneten Ansätze wurden bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Der Rest der Extrakte wurde für die IPs verwendet.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden ChIP-Experimente sowohl mit Protein A- als auch mit HA-getagten Proteinen durchgeführt. Wenn Prot. A-Fusionsproteine präzipitiert werden sollten, wurden die Chromatinextrakte zunächst mit eiskaltem Lysepuffer auf ein Gesamtvolumen von 1200 µl gebracht, bevor sie in 1,5 ml-Eppendorfgefäßen mit 30-50 µl IgG-Sepharose 6 Fast Flow (Amersham, 4 °C) vermischt wurden (zum Prinzip der Präzipitation siehe Kap. 4.9.8). Die Affinitätsmatrix war zuvor dreimal mit PBS gewaschen worden. Die Ansätze wurden bei 4 °C für 2 h auf dem Drehrad inkubiert. Zur Präzipitation von HA-getagten Proteinen wurden die Extrakte zunächst 60 min lang bei 4 °C mit 15 µl α-HA 3F10-Antikörper (100 µg/ml, Roche Diagnostics, -20 °C) vorinkubiert, bevor die Ansätze zu 50 µl Protein G-Sepharose 4 Fast Flow (Amersham, 4 °C) gegeben und für weitere 90 min bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert wurden. Zur Entfernung unspezifisch mit der Affinitätsmatrix interagierender Proteine wurden die Präzipitate im Anschluss mehrmals stringent gewaschen. An drei Waschschrte mit Lysepuffer schlossen sich zwei Inkubationen mit Waschpuffer I und nochmals zwei Waschschrte mit Waschpuffer II an. Dabei

wurden die Präzipitate jeweils mit 500 µl eiskaltem Puffer vermischt und für 3 min bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert, bevor die Ansätze zentrifugiert (1 min, 8000 rpm, 4 °C) und die Überstände mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt wurden. Durch einen letzten Waschschrift mit TE-Puffer wurden die Präzipitate von Salzen und Detergenzien befreit.

Anschließend wurden die präzipitierten Protein-DNA-Komplexe von der Affinitätsmatrix eluiert, indem 140 µl TE/1 % (w/v) SDS zu den Präzipitaten gegeben wurden. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 65 °C wurde die Affinitätsmatrix sedimentiert (1 min, 13.000 rpm, RT). Von den Überständen, welche im Folgenden als IPs bezeichnet werden, wurden 120 µl in frische 500 µl-Eppendorfgefäße überführt und zusammen mit den auf Eis aufbewahrten INPUT-Ansätzen weiterverarbeitet.

Lysepuffer	50 mM HEPES (pH 7,5), 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % (v/v) Triton X-100, 0,1 % (w/v) DOC, 4 °C
Waschpuffer I	50 mM HEPES (pH 7,5), 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % (v/v) Triton X-100, 0,1 % (w/v) DOC, 4 °C
Waschpuffer II	10 mM Tris (pH 8,0), 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 0,5 % (v/v) Nonidet P40, 0,5 % (w/v) DOC, 4 °C

4.10.4 Aufhebung des Crosslinks und Proteinase K-Behandlung

Der Formaldehyd-Crosslink wurde revertiert, indem die INPUT- und IP-Proben üN in einem PCR-Gerät (PCRSprint, Hybaid) auf 65 °C erhitzt wurden.

Bevor die DNA gefällt werden konnte, mussten zunächst die in den Proben enthaltenen Proteine, inklusive der IP-Antikörper, verdaut werden. Dazu wurden alle Ansätze mit 130 µl frisch hergestelltem Proteinase K-Prämix versetzt und 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt.

Proteinase K-Prämix	1,54 mg/ml Proteinase K (20 mg/ml Stocklsg., -20 °C, Sigma), 77 µg/ml Glykogen (5 mg/ml, Ambion, -20 °C) in TE-Puffer
---------------------	--

4.10.5 DNA-Fällung

Im Anschluss an den Proteinase K-Verdau wurden alle Proben mit 1/10 Volumen (25 µl) 5 M LiCl/50 mM Tris (pH 8,0) und dem gleichen Volumen (250 µl) Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, Roth, 4 °C) versetzt, 2 min gevortext und 5 min bei 4 °C mit 13.000 rpm zentrifugiert, um die wässrige von der organischen Phase zu trennen. 200 µl der wässrigen Überstände wurden vorsichtig abgenommen und in frischen 1,5 ml-Cups mit dem dreifachen Volumen (600 µl) EtOH_{abs.} (Endkonz.: 75 %) vermischt. Im Anschluss an eine 1-2-stündige Inkubation bei -20 °C wurde die gefällte DNA sedimentiert (20 min, 13.000 rpm, 4 °C). Die DNA-Pellets wurden einmal mit 70 % EtOH (-20 °C) gewaschen und dann für ca. 10 min in der

Speed-Vac (Savant) getrocknet. Sowohl die INPUT- als auch die IP-DNA wurden in 50 µl TE-Puffer resuspendiert und bei -20 °C aufbewahrt. Die Auswertung der ChIP-Experimente mittels quantitativer PCR ist in Kap. 4.7.7 beschrieben.

4.10.6 Überprüfung der DNA-Fragmentlänge

Durch die Ultraschallbehandlung der Zellextrakte sollten wie bereits erwähnt DNA-Fragmente mit einer durchschnittlichen Länge von 0,5-1,0 kb erzeugt werden. Bei den meisten in dieser Arbeit durchgeführten ChIP-Experimenten wurde der Erfolg der Fragmentierung mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Dazu wurden 5 µl INPUT- und IP-DNA mit je 0,5 µl RNase (DNase-frei, Roche) versetzt und 30-45 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl 5x DNA-Probenpuffer wurden die Ansätze in Gegenwart eines geeigneten Molekulargewichtsstandards in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt (zur Durchführung der Agarosegelelektrophorese siehe Kap. 4.7.1). Unter UV-Licht war bei erfolgreich durchgeführter Fragmentierung auf einer Höhe von 500-1000 bp ein DNA-Schmier zu erkennen.

4.10.7 Nachweis der Pol I-Rrn3p-Interaktion durch Chromatin-IPs

Der in dieser Arbeit für ChIP-Experimente verwendete Crosslinker Formaldehyd vernetzt in lebenden Hefezellen nicht nur Proteine und DNA, sondern auch interagierende Proteine miteinander. Aufgrund dessen eignen sich Chromatin-IPs, ebenso wie die in Kap. 4.9.8.2 beschriebenen Koimmunpräzipitationen, zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen. In der vorliegenden Arbeit wurde die RNA-Polymerase I-Rrn3p-Interaktion unter Zuhilfenahme des Chromatin-IP-Protokolls (siehe Kap. 4.10.3) charakterisiert. Aus je 250 µl der zur Verfügung stehenden Chromatinextrakte wurde mit einem monoklonalen α -HA-Antikörper (3F10, 100 µg/ml, Roche) die HA-getagte Pol I-Untereinheit A43 präzipitiert. Lysate von ungetagten Stämmen mit ansonst gleichem Genotyp wurden identisch behandelt (= Hintergrund-Kontrollen). Im Anschluss an den letzten Waschschritt wurden die angereicherten Proteinkomplexe von der Affinitätsmatrix eluiert, indem die Präzipitate mit 50 µl frischem 4x SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min auf 95 °C erhitzt wurden. Anschließend wurde die Protein G-Sepharose sedimentiert (1 min, 13.000 rpm, RT). Die Überstände wurden in frische 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt. Bevor die IPs in einem Western-Blot analysiert werden konnten, musste der Formaldehyd-Crosslink revertiert werden. Zum Aufheben von Protein-Protein-Vernetzungen werden höhere Temperaturen benötigt als zum Revertieren eines Protein-DNA-Crosslinks, weswegen die Proben nochmals für 20-30 min auf 95 °C erhitzt wurden. Danach wurden die IPs bei -20 °C gelagert.

50 % (25 µl) der IPs sowie 1 % (2,5 µl) der INPUTs wurden anschließend einer Western-Blot-Analyse unterzogen, wobei sowohl die HA-getagte Pol I-Untereinheit A43 als auch der mit Protein A fusionierte Interaktionspartner Rrn3p mit Hilfe spezifischer Antikörper sichtbar gemacht wurden.

4.11 Immunfluoreszenzmikroskopie

Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie kann die subzelluläre Lokalisation von Proteinen in Hefezellen untersucht werden. Bei dem in dieser Arbeit angewandten indirekten Zwei-Schritt-Verfahren werden die zu untersuchenden Hefekulturen zunächst fixiert. Um das Innere der Zellen für Antikörper zugänglich zu machen, werden anschließend die Zellwände lysiert. Die dabei erzeugten Hefe-Sphäroplasten werden auf Deckgläser aufgetragen, auf denen sie zuerst mit einem nicht-ionischen Detergens behandelt werden, um Zytoplasma- und Kernmembranen für die nachfolgend applizierten Immunglobuline durchlässig zu machen. Anschließend werden die Sphäroplasten mit einem Primär-Antikörper inkubiert, der spezifisch an das zu analysierende Protein bindet. Danach wird ein Sekundär-Antikörper zu den Sphäroplasten gegeben, der den F_C-Teil des verwendeten Primär-Antikörpers erkennt und mit einem Fluorochrom (z.B. Alexa Fluor® 594) markiert ist. Zum Schluss werden die Sphäroplasten auf Objektträgern eingebettet, wobei das Mounting-Medium den fluoreszierenden DNA-Farbstoff DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid) enthalten kann, der eine Visualisierung des Zellkerns ermöglicht. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops können die Immunkomplexe anschließend sichtbar gemacht und so das zu analysierende Protein bestimmten Zellkompartimenten zugeordnet werden. Die im Folgenden beschriebene Vorgehensweise basiert auf einem von Léger-Silvestre und Kollegen entwickelten Protokoll (Léger-Silvestre et al., 2004) und diente der Lokalisierung des Transkriptionsfaktors Rrn3p, der in den verwendeten Hefestämmen entweder als Prot.A- oder als TAP-Fusionsprotein vorlag.

4.11.1 Vorbereitung der Deckgläser

Runde Deckgläser mit einem Durchmesser von 15 mm (Roth) wurden durch 30-minütiges Kochen in 0,1 M HCl gereinigt, 10-mal mit H₂O_{Millipore} gespült und anschließend in H₂O_{Millipore} autoklaviert, sodass sie über einen längeren Zeitraum bei 4 °C aufbewahrt werden konnten. Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Deckgläser getrocknet und mit 50 µl Poly-L-Lysin 0,1 % (Sigma) überschichtet. Nach 5-10 min wurde die Flüssigkeit vollständig abgesaugt, und die Deckgläser wurden *in vacuo* bei RT getrocknet.

4.11.2 Fixierung der Hefezellen

Zum Fixieren wurde in dieser Arbeit 16 % Paraformaldehyd (EM grade, Electron Microscopy Science) verwendet. Sobald die zu untersuchenden Hefestämme eine OD₆₀₀ von ungefähr 0,75 erreicht hatten, wurden 15 ml Kultur in 15 ml-Falcongefäßen abzentrifugiert (3 min, 3000 rpm, RT). Vom überstehenden Medium wurden 12 ml abgesaugt, woraufhin die Hefepellets in den verbleibenden 3 ml Medium resuspendiert wurden. Nach Zugabe von 1 ml 16 % Paraformaldehyd (Endkonz.: 4 % (v/v) Paraformaldehyd) wurden die Hefesuspensionen 30 min bei der Wachstums-

temperatur der jeweiligen Hefekultur geschüttelt. Die fixierten Hefezellen wurden pelletiert (3 min, 3000 rpm, RT), mit 10 ml Puffer B gewaschen und nochmals abzentrifugiert.

Puffer B	1,2 M Sorbitol, 8,44 mM K ₂ HPO ₄ , 1,34 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,5), autoklavieren, 4 °C
----------	--

4.11.3 Herstellung der Sphäroplasten

Immunglobuline können nur in das Innere von Hefezellen gelangen, wenn zuvor die Zellwände entfernt wurden. In dieser Arbeit wurde zur Lyse der zu 80-90 % aus Kohlenhydraten bestehenden Hefezellwände das Enzym Zymolyase 100T von Seikagaku Corporation (Aufbewahrung bei 4 °C) eingesetzt. Die fixierten Hefen wurden in 500 µl frisch hergestelltem Zymolyase-Mix resuspendiert und für 30-45 min bei 30 °C inkubiert. Die so gewonnenen Sphäroplasten wurden sedimentiert (3 min, 3000 rpm, RT), vorsichtig in 500 µl kaltem Puffer B resuspendiert, bei 4 °C pelletiert und in 200-400 µl kaltem 16 % Paraformaldehyd aufgenommen. Anschließend wurden die Sphäroplasten entweder sofort immungefärbt oder vorübergehend bei -20 °C gelagert.

Zymolyase-Mix	2 mM Ribonukleosid-Vanadyl-Komplex (NEB, -20 °C) 0,2 mM PMSF (100 mM in EtOH _{abs.} , -20 °C) 28,6 mM β-Mercaptoethanol 50 µg/ml Zymolyase 100T (5 mg/ml in H ₂ O _{Millipore} , -20 °C) in Puffer B
---------------	--

4.11.4 Immunlokalisation

Die nachfolgend beschriebenen Antikörper-Inkubationen wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt, die Waschschritte erfolgten hingegen in 12-Loch-Zellkulturschalen (Nunc). Bei allen Arbeitsschritten war darauf zu achten, dass die empfindlichen Sphäroplasten nicht austrockneten. 40 µl der in Paraformaldehyd resuspendierten Sphäroplasten wurden auf die beschichteten Deckgläser getropft und durch eine 30-60-minütige Inkubation bei 4 °C auf der Glasoberfläche immobilisiert. Nachdem überschüssige Sphäroplasten vorsichtig abgesaugt worden waren, wurden die Deckgläser kurz mit 2 ml TBS überschichtet, bevor sie anschließend einmal 5 min mit TBS/BSA und zweimal 5 min mit TBS/BSA/NP40 gewaschen wurden.

Danach wurden die Deckgläser mit der Zellseite nach unten in 40 µl Primär-Antikörper-Lösung gelegt. Hierbei handelte es sich um eine 1:50.000-Verdünnung eines polyklonalen α-Protein A-Antikörpers (rabbit, Sigma-Aldrich, -20 °C) in TBS/BSA. Die Inkubation erfolgte üN bei einer Temperatur von 4 °C und zog drei jeweils 5-minütige Waschschritte mit TBS/BSA, TBS/BSA/NP40 und TBS/BSA nach sich. Anschließend wurden die Deckgläser für die Dauer von 2 h in 40 µl Sekundär-Antikörper-Lösung gelegt (Goat-α-rabbit IgG (H+L)-Alexa Fluor® 594, Molecular Probes/Invitrogen, -20 °C, 1:500 in TBS/BSA), wobei die Inkubation zum Schutz des

Fluorochroms im Dunkeln durchgeführt wurde. Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS/BSA, TBS/BSA/NP40 und TBS/BSA wurden die Deckgläser auf Objektträgern (~76 x 26 x 1 mm, Marienfeld) in je 5 µl Mowiol-Mounting-Medium eingebettet, welches zuvor mit 1 µg/ml DAPI (Hoechst, 5 mg/ml Stock-Lsg., 4 °C) versetzt worden war. Die Objektträger wurden abgedunkelt bei 4 °C aufbewahrt.

Mit Hilfe eines Axiovert 200M-Fluoreszenzmikroskops von Zeiss, welches mit einer digitalen Kamera (AxioCam MR, AxioVision-Software, Zeiss) ausgestattet ist, wurden die Immunkomplexe sichtbar gemacht. Zur Betrachtung der Objekte wurde ein 63x/1,4-Ölobjektiv gewählt. Zunächst wurde von den Sphäroplasten ein Phasenkontrastbild (DIC-Bild) aufgenommen. Die Anregungswellenlänge für die Analyse der DAPI-Signale (blaue Fluoreszenz) lag bei 359 nm, wohingegen das Fluorochrom Alexa 594 (rote Fluoreszenz) mit Licht der Wellenlänge 590 nm angeregt wurde. Die Belichtungszeiten variierten in Abhängigkeit von der Signalintensität. Für die abschließende Bearbeitung der Aufnahmen wurde das Adobe-Programm Photoshop 7.0 verwendet.

10x TBS	1,36 M NaCl, 27 mM KCl, 125 mM Tris/HCl (pH 7,4)
TBS/BSA	0,1 % (w/v) BSA in 1x TBS
TBS/BSA/NP40	0,1 % (w/v) BSA, 0,1 % (v/v) Nonidet P40 in 1x TBS
Mowiol-Mounting-Medium	2,4 g Mowiol 4-88 (Calbiochem, 4 °C) und 6 g Glycerin in 50 ml-Falcon geben, mischen 6 ml H ₂ O _{Millipore} dazugeben, 2 h bei RT inkubieren 12 ml 0,2 M Tris (pH 8,5) hinzugeben, mischen 10 min unter Schütteln in 50 °C-Wasserbad inkubieren auf 4 °C bringen, 15 min mit 5000 g zentrifugieren aliquotieren und bei -20 °C aufbewahren

4.12 Verwendete Computer-Software

Das vorliegende Manuskript wurde mit Hilfe von Microsoft Office Word 2003 angefertigt. Abbildungen wurden mit den Programmen Adobe Photoshop 7.0, Microsoft Office PowerPoint 2003, Microsoft Office Excel 2003 und Microcal Origin 6.0 Professional erzeugt. Das Literaturverzeichnis wurde mit EndNote7 erstellt. Zur Erzeugung einer PDF-Version wurde das Adobe-Programm Acrobat 6.0 Professional verwendet.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ribosomensynthese findet nur in wachsenden eukaryotischen Zellen statt. Sobald ein Wachstumsarrest eintritt, werden sowohl die rRNA-Synthese als auch die RP (ribosomale Proteine)-Genexpression inhibiert. Die nukleolären rRNA-Gene werden in Eukaryoten von der RNA-Polymerase I (Pol I) transkribiert. Diese synthetisiert ein Vorläufertranskript (Prä-rRNA), aus dem mit der 18S-, der 5,8S- und der 28S/25S-rRNA drei der vier reifen eukaryotischen rRNAs hervorgehen. Um die Transkription an den Promotoren der rRNA-Gene initiieren zu können, muss die RNA-Polymerase I mit dem Transkriptionsfaktor Rrn3(p) assoziiert sein. Sowohl in Säugern als auch in der Hefe *S. cerevisiae* rekrutiert Rrn3(p) das Enzym an den Transkriptionsstartpunkt. Da wachstumsarretierte Zellen deutlich geringere Mengen des zur Initiation benötigten Pol I-Rrn3(p)-Komplexes aufweisen als wachsende Zellen, wurde postuliert, dass die rRNA-Synthese auf der Ebene der Transkriptionsinitiation über die Menge der Pol I-Rrn3p-Komplexe reguliert wird.

Während in Säugern die Komplexbildung über den Phosphorylierungsstatus und die Lokalisation des Rrn3 kontrolliert wird, scheint in *S. cerevisiae* ein anderer Mechanismus in die Regulation der Pol I-Transkription involviert zu sein. Wie in der vorliegenden Doktorarbeit erstmalig demonstriert werden konnte, wird bei einem durch Aminosäuredepletion oder Rapamycinbehandlung induzierten Wachstumsarrest ein Großteil des Hefe-Rrn3p vom 26S-Proteasom degradiert. Um feststellen zu können, ob der Abbau des Rrn3p für die wachstumsabhängige Regulation der rRNA-Synthese von Bedeutung ist, wurde zunächst ein Hefestamm analysiert, in dem das Rrn3p-Expressionsniveau künstlich variiert werden kann. Hierbei zeigte sich, dass die in wachsenden Hefen vorkommende Rrn3p-Menge die Syntheseleistung der Pol I beeinflusst. Außerdem wurde auf eine Mutante zurückgegriffen, die ein N-terminal verkürztes Rrn3p-Prot.A-Fusionsprotein exprimiert. Wie sich während dieser Promotion herausstellte, wird die trunkierte Rrn3p-Version unter ungünstigen Wachstumsbedingungen nicht abgebaut. Nach Aminosäuredepletion wurde in der Deletionsmutante die Menge der Pol I-Rrn3p-Komplexe zwar ebenfalls herunterreguliert, der Komplexverlust fiel allerdings wesentlich schwächer aus als im isogenen Wildtyp. Ferner wies der Stamm im wachstumsarretierten Zustand deutlich erhöhte Mengen rDNA-assoziierte Pol I auf. Zudem wurde in rapamycinbehandelten Zellen der Mutante eine verzögerte Repression der 35S-prä-rRNA-Synthese beobachtet. Eine wachstumsabhängige Relokalisation des Rrn3p, wie sie für das Säugerhomologe beschrieben ist, wurde hingegen nicht festgestellt.

Somit tragen in wachstumsinhibierten *S. cerevisiae*-Zellen proteolytische Vorgänge zur Inaktivierung der rRNA-Synthese bei. Da bei einem Wachstumsarrest ein Großteil des Pol I-spezifischen Transkriptionsfaktors Rrn3p vom 26S-Proteasom degradiert wird, kommt es zu einem deutlichen Verlust an initiationskompetenten Pol I-Rrn3p-Komplexen. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, führt dies zu einer verminderten Rekrutierung des Enzyms an die rDNA und zu einer Herunterregulierung der Prä-rRNA-Synthese.

Die über den Rrn3p-Abbau vermittelte Repression der Pol I-Transkription scheint allerdings nicht allein dafür verantwortlich zu sein, dass bei Nährstoffmangel keine reifen rRNAs mehr synthetisiert werden. Denn in den rapamycinbehandelten Zellen der Deletionsmutante und des Wildtyps waren bereits nach kurzer Zeit fast keine rRNA-Prozessierungsprodukte mehr nachweisbar, unabhängig davon wieviel 35S-rRNA noch hergestellt wurde. Angesichts dieser Beobachtung scheint die rRNA-Synthese bei einem Wachstumsarrest vor allem auf der Ebene der rRNA-Prozessierung reprimiert zu werden, und nicht, wie bisher angenommen, auf der Ebene der Pol I-Initiation. Wie bereits erwähnt, wird die RP-Gen-Transkription in wachstumsarretierten Hefen ebenfalls inhibiert. Es ist möglich, dass deswegen keine ribosomalen Proteine mehr an die rRNA-Vorläufer assemblieren und deshalb die rRNA-Prozessierung unter ungünstigen Wachstumsbedingungen zum Erliegen kommt. Demzufolge würde bei einem Wachstumsarrest die rRNA-Synthese entscheidend über die RP-Genexpression reguliert werden, und nicht, wie bisher vermutet, hauptsächlich über die Menge der initiationskompetenten Pol I-Rrn3p-Komplexe. Anhand der in dieser Doktorarbeit präsentierten Ergebnisse sollte das derzeit gültige Modell zur wachstumsabhängigen Regulation der rRNA-Synthese kritisch überarbeitet werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Allmang, C., Mitchell, P., Petfalski, E., and Tollervey, D. (2000). Degradation of ribosomal RNA precursors by the exosome. *Nucleic Acids Res* 28, 1684-1691.
- Aprikian, P., Moorefield, B., and Reeder, R. H. (2001). New model for the yeast RNA polymerase I transcription cycle. *Mol Cell Biol* 21, 4847-4855.
- Arino, J., and Herrero, E. (2003). Use of tetracycline-regulatable promoters for functional analysis of protein phosphatases in yeast. *Methods Enzymol* 366, 347-358.
- Bartsch, I., Schoneberg, C., and Grummt, I. (1988). Purification and characterization of TTFI, a factor that mediates termination of mouse ribosomal DNA transcription. *Mol Cell Biol* 8, 3891-3897.
- Bateman, E., and Paule, M. R. (1986). Regulation of eukaryotic ribosomal RNA transcription by RNA polymerase modification. *Cell* 47, 445-450.
- Bell, G. I., Valenzuela, P., and Rutter, W. J. (1976). Phosphorylation of yeast RNA polymerases. *Nature* 261, 429-431.
- Bell, G. I., Valenzuela, P., and Rutter, W. J. (1977). Phosphorylation of yeast DNA-dependent RNA polymerases in vivo and in vitro. Isolation of enzymes and identification of phosphorylated subunits. *J Biol Chem* 252, 3082-3091.
- Beven, A. F., Lee, R., Razaz, M., Leader, D. J., Brown, J. W., and Shaw, P. J. (1996). The organization of ribosomal RNA processing correlates with the distribution of nucleolar snRNAs. *J Cell Sci* 109 (Pt 6), 1241-1251.
- Bier, M. (2004) Untersuchungen zur Transkriptionsaktivität der RNA-Polymerase I in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, Dissertation, Universität Heidelberg.
- Bier, M., Fath, S., and Tschochner, H. (2004). The composition of the RNA polymerase I transcription machinery switches from initiation to elongation mode. *FEBS Lett* 564, 41-46.
- Bischler, N., Balavoine, F., Milkereit, P., Tschochner, H., Mioskowski, C., and Schultz, P. (1998). Specific interaction and two-dimensional crystallization of histidine tagged yeast RNA polymerase I on nickel-chelating lipids. *Biophys J* 74, 1522-1532.
- Bischler, N., Brino, L., Carles, C., Riva, M., Tschochner, H., Mallouh, V., and Schultz, P. (2002). Localization of the yeast RNA polymerase I-specific subunits. *Embo J* 21, 4136-4144.
- Bodem, J., Dobrev, G., Hoffmann-Rohrer, U., Iben, S., Zentgraf, H., Delius, H., Vingron, M., and Grummt, I. (2000). TIF-IA, the factor mediating growth-dependent control of ribosomal RNA synthesis, is the mammalian homolog of yeast Rrn3p. *EMBO Rep* 1, 171-175.
- Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G., and Fink, G. R. (1987). 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol* 154, 164-175.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Breant, B., Buhler, J. M., Sentenac, A., and Fromageot, P. (1983). On the phosphorylation of yeast RNA polymerases A and B. *Eur J Biochem* 130, 247-251.
- Brodersen, D. E., and Nissen, P. (2005). The social life of ribosomal proteins. *Febs J* 272, 2098-2108.

- Buhler, J. M., Huet, J., Davies, K. E., Sentenac, A., and Fromageot, P. (1980). Immunological studies of yeast nuclear RNA polymerases at the subunit level. *J Biol Chem* 255, 9949-9954.
- Buhler, J. M., Iborra, F., Sentenac, A., and Fromageot, P. (1976). Structural studies on yeast RNA polymerases. Existence of common subunits in RNA polymerases A(I) and B(II). *J Biol Chem* 251, 1712-1717.
- Buttgereit, D., Pflugfelder, G., and Grummt, I. (1985). Growth-dependent regulation of rRNA synthesis is mediated by a transcription initiation factor (TIF-IA). *Nucleic Acids Res* 13, 8165-8180.
- Carles, C., and Riva, M. (1998). Yeast RNA Polymerase I Subunits und Genes. In *Transcription of Ribosomal RNA Genes by Eukaryotic RNA Polymerase I*, M. R. Paule, ed. (Springer-Verlag and R.G. Landes Company).
- Cavanaugh, A. H., Hirschler-Laszkiewicz, I., Hu, Q., Dundr, M., Smink, T., Misteli, T., and Rothblum, L. I. (2002). Rrn3 phosphorylation is a regulatory checkpoint for ribosome biogenesis. *J Biol Chem* 277, 27423-27432.
- Chi, Y., Huddleston, M. J., Zhang, X., Young, R. A., Annan, R. S., Carr, S. A., and Deshaies, R. J. (2001). Negative regulation of Gcn4 and Msn2 transcription factors by Srb10 cyclin-dependent kinase. *Genes Dev* 15, 1078-1092.
- Choe, S. Y., Schultz, M. C., and Reeder, R. H. (1992). In vitro definition of the yeast RNA polymerase I promoter. *Nucleic Acids Res* 20, 279-285.
- Ciechanover, A. (2004). Intracellular protein degradation: From a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Exp Biol Med* 231, 1197-1211.
- Claypool, J. A., French, S. L., Johzuka, K., Eliason, K., Vu, L., Dodd, J. A., Beyer, A. L., and Nomura, M. (2004). Tor pathway regulates Rrn3p-dependent recruitment of yeast RNA polymerase I to the promoter but does not participate in alteration of the number of active genes. *Mol Biol Cell* 15, 946-956.
- Conconi, A., Widmer, R. M., Koller, T., and Sogo, J. M. (1989). Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell* 57, 753-761.
- Cormack, B. P., and Struhl, K. (1992). The TATA-binding protein is required for transcription by all three nuclear RNA polymerases in yeast cells. *Cell* 69, 685-696.
- Dammann, R., Lucchini, R., Koller, T., and Sogo, J. M. (1993). Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 21, 2331-2338.
- Dragon, F., Gallagher, J. E., Compagnone-Post, P. A., Mitchell, B. M., Porwancher, K. A., Wehner, K. A., Wormsley, S., Settlage, R. E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., *et al.* (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* 417, 967-970.
- Fan, H., and Penman, S. (1971). Regulation of synthesis and processing of nucleolar components in metaphase-arrested cells. *J Mol Biol* 59, 27-42.
- Fath, S. (2002) Untersuchungen zur Regulation der Ribosomen-Biogenese in *Saccharomyces cerevisiae*, Dissertation, Universität Heidelberg.
- Fath, S., Kobor, M. S., Philippi, A., Greenblatt, J., and Tschochner, H. (2004). Dephosphorylation of RNA polymerase I by Fcp1p is required for efficient rRNA synthesis. *J Biol Chem* 279, 25251-25259.

- Fath, S., Milkereit, P., Peyroche, G., Riva, M., Carles, C., and Tschochner, H. (2001). Differential roles of phosphorylation in the formation of transcriptional active RNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14334-14339.
- Fatica, A., and Tollervey, D. (2002). Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol* 14, 313-318.
- Feldman, R. M., Correll, C. C., Kaplan, K. B., and Deshaies, R. J. (1997). A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* 91, 221-230.
- Ferreira-Cerca, S., Poll, G., Gleizes, P. E., Tschochner, H., and Milkereit, P. (2005). Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. *Mol Cell* 20, 263-275.
- French, S. L., Osheim, Y. N., Cioci, F., Nomura, M., and Beyer, A. L. (2003). In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes. *Mol Cell Biol* 23, 1558-1568.
- Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., and Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* 313, 17-42.
- Gadal, O., Labarre, S., Boschiero, C., and Thuriaux, P. (2002). Hmo1, an HMG-box protein, belongs to the yeast ribosomal DNA transcription system. *Embo J* 21, 5498-5507.
- Gallagher, J. E., Dunbar, D. A., Granneman, S., Mitchell, B. M., Osheim, Y., Beyer, A. L., and Baserga, S. J. (2004). RNA polymerase I transcription and pre-rRNA processing are linked by specific SSU processome components. *Genes Dev* 18, 2506-2517.
- Gallego, C., Gari, E., Colomina, N., Herrero, E., and Aldea, M. (1997). The Cln3 cyclin is down-regulated by translational repression and degradation during the G1 arrest caused by nitrogen deprivation in budding yeast. *Embo J* 16, 7196-7206.
- Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1997). A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 837-848.
- Gerber, J., Reiter, A., Steinbauer, R., Jakob, S., Kuhn, C.-D., Cramer, P., Griesenbeck, J., Milkereit, P., and Tschochner, H. (eingereicht). Site-specific phosphorylation of yeast RNA polymerase I.
- Gonda, K., Fowler, J., Katoku-Kikyo, N., Haroldson, J., Wudel, J., and Kikyo, N. (2003). Reversible disassembly of somatic nucleoli by the germ cell proteins FRGY2a and FRGY2b. *Nat Cell Biol* 5, 205-210.
- Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5547-5551.
- Grummt, F., Paul, D., and Grummt, I. (1977). Regulation of ATP pools, rRNA and DNA synthesis in 3T3 cells in response to serum or hypoxanthine. *Eur J Biochem* 76, 7-12.
- Grummt, I. (1999). Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 62, 109-154.
- Grummt, I. (2003). Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev* 17, 1691-1702.
- Grummt, I. (2006). Actin and myosin as transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* 16, 191-196.
- Grummt, I., Smith, V. A., and Grummt, F. (1976). Amino acid starvation affects the initiation frequency of nucleolar RNA polymerase. *Cell* 7, 439-445.

- Hall, D. B., Wade, J. T., and Struhl, K. (2006). An HMG protein, Hmo1, associates with promoters of many ribosomal protein genes and throughout the rRNA gene locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 26, 3672-3679.
- Haltiner, M. M., Smale, S. T., and Tjian, R. (1986). Two distinct promoter elements in the human rRNA gene identified by linker scanning mutagenesis. *Mol Cell Biol* 6, 227-235.
- Hannan, K. M., Brandenburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaugh, A., Rothblum, L., Moss, T., Poortinga, G., McArthur, G. A., Pearson, R. B., and Hannan, R. D. (2003). mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Mol Cell Biol* 23, 8862-8877.
- Hecht, A., and Grunstein, M. (1999). Mapping DNA interaction sites of chromosomal proteins using immunoprecipitation and polymerase chain reaction. *Methods Enzymol* 304, 399-414.
- Hernandez-Verdun, D. (2006). The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. *Histochem Cell Biol* 126, 135-148.
- Hiller, M. M., Finger, A., Schweiger, M., and Wolf, D. H. (1996). ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 273, 1725-1728.
- Hirschler-Laszkiewicz, I., Cavanaugh, A. H., Mirza, A., Lun, M., Hu, Q., Smink, T., and Rothblum, L. I. (2003). Rrn3 becomes inactivated in the process of ribosomal DNA transcription. *J Biol Chem* 278, 18953-18959.
- Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* 30, 405-439.
- Hughes, T. R., Marton, M. J., Jones, A. R., Roberts, C. J., Stoughton, R., Armour, C. D., Bennett, H. A., Coffey, E., Dai, H., He, Y. D., *et al.* (2000). Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell* 102, 109-126.
- Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S., and O'Shea, E. K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686-691.
- Iben, S., Tschochner, H., Bier, M., Hoogstraten, D., Hozak, P., Egly, J. M., and Grummt, I. (2002). TFIIF plays an essential role in RNA polymerase I transcription. *Cell* 109, 297-306.
- Irniger, S., and Braus, G. H. (2003). Controlling transcription by destruction: the regulation of yeast Gcn4p stability. *Curr Genet* 44, 8-18.
- Jacob, S. T. (1995). Regulation of ribosomal gene transcription. *Biochem J* 306 (Pt 3), 617-626.
- Jansa, P., and Grummt, I. (1999). Mechanism of transcription termination: PTRF interacts with the largest subunit of RNA polymerase I and dissociates paused transcription complexes from yeast and mouse. *Mol Gen Genet* 262, 508-514.
- Jordan, P., Mannervik, M., Tora, L., and Carmo-Fonseca, M. (1996). In vivo evidence that TATA-binding protein/SL1 colocalizes with UBF and RNA polymerase I when rRNA synthesis is either active or inactive. *J Cell Biol* 133, 225-234.
- Ju, Q., and Warner, J. R. (1994). Ribosome synthesis during the growth cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 151-157.
- Keener, J., Dodd, J. A., Lalo, D., and Nomura, M. (1997). Histones H3 and H4 are components of upstream activation factor required for the high-level transcription of yeast rDNA by RNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13458-13462.
- Keener, J., Josaitis, C. A., Dodd, J. A., and Nomura, M. (1998). Reconstitution of yeast RNA polymerase I transcription in vitro from purified components. TATA-binding protein is not required for basal transcription. *J Biol Chem* 273, 33795-33802.

- Keys, D. A., Lee, B. S., Dodd, J. A., Nguyen, T. T., Vu, L., Fantino, E., Burson, L. M., Nogi, Y., and Nomura, M. (1996). Multiprotein transcription factor UAF interacts with the upstream element of the yeast RNA polymerase I promoter and forms a stable preinitiation complex. *Genes Dev* 10, 887-903.
- Keys, D. A., Vu, L., Steffan, J. S., Dodd, J. A., Yamamoto, R. T., Nogi, Y., and Nomura, M. (1994). RRN6 and RRN7 encode subunits of a multiprotein complex essential for the initiation of rDNA transcription by RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 8, 2349-2362.
- Kiss, T. (2004). Biogenesis of small nuclear RNPs. *J Cell Sci* 117, 5949-5951.
- Klinger, C., Huet, J., Song, D., Petersen, G., Riva, M., Bautz, E. K., Sentenac, A., Oudet, P., and Schultz, P. (1996). Localization of yeast RNA polymerase I core subunits by immunoelectron microscopy. *Embo J* 15, 4643-4653.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., and Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* 15, 963-972.
- Kressler, D., Linder, P., and de La Cruz, J. (1999). Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 7897-7912.
- Kuai, L., Fang, F., Butler, J. S., and Sherman, F. (2004). Polyadenylation of rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8581-8586.
- Kulkens, T., Riggs, D. L., Heck, J. D., Planta, R. J., and Nomura, M. (1991). The yeast RNA polymerase I promoter: ribosomal DNA sequences involved in transcription initiation and complex formation in vitro. *Nucleic Acids Res* 19, 5363-5370.
- LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A., and Tollervey, D. (2005). RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* 121, 713-724.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laferte, A., Favry, E., Sentenac, A., Riva, M., Carles, C., and Chedin, S. (2006). The transcriptional activity of RNA polymerase I is a key determinant for the level of all ribosome components. *Genes Dev* 20, 2030-2040.
- Lalo, D., Steffan, J. S., Dodd, J. A., and Nomura, M. (1996). RRN11 encodes the third subunit of the complex containing Rrn6p and Rrn7p that is essential for the initiation of rDNA transcription by yeast RNA polymerase I. *J Biol Chem* 271, 21062-21067.
- Lang, W. H., Morrow, B. E., Ju, Q., Warner, J. R., and Reeder, R. H. (1994). A model for transcription termination by RNA polymerase I. *Cell* 79, 527-534.
- Lang, W. H., and Reeder, R. H. (1995). Transcription termination of RNA polymerase I due to a T-rich element interacting with Reb1p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9781-9785.
- Leger-Silvestre, I., and Gas, N. (2004). The nucleolar ultrastructure in yeast. In *The Nucleolus*, M. O. Olson, ed. (Landes Bioscience), pp. 21-28.
- Leger-Silvestre, I., Milkereit, P., Ferreira-Cerca, S., Saveanu, C., Rousselle, J. C., Choesmel, V., Guinefoleau, C., Gas, N., and Gleizes, P. E. (2004). The ribosomal protein Rps15p is required for nuclear exit of the 40S subunit precursors in yeast. *Embo J* 23, 2336-2347.
- Leger-Silvestre, I., Trumtel, S., Noaillac-Depeyre, J., and Gas, N. (1999). Functional compartmentalization of the nucleus in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma* 108, 103-113.

- Li, H., Tsang, C. K., Watkins, M., Bertram, P. G., and Zheng, X. F. (2006a). Nutrient regulates Tor1 nuclear localization and association with rDNA promoter. *Nature* 442, 1058-1061.
- Li, J., Langst, G., and Grummt, I. (2006b). NoRC-dependent nucleosome positioning silences rRNA genes. *Embo J* 25, 5735-5741.
- Lo, R. S., and Massague, J. (1999). Ubiquitin-dependent degradation of TGF-beta-activated smad2. *Nat Cell Biol* 1, 472-478.
- Mayer, C., Bierhoff, H., and Grummt, I. (2005). The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-IA and down-regulates rRNA synthesis. *Genes Dev* 19, 933-941.
- Mayer, C., and Grummt, I. (2005). Cellular stress and nucleolar function. *Cell Cycle* 4, 1036-1038.
- Mayer, C., Zhao, J., Yuan, X., and Grummt, I. (2004). mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev* 18, 423-434.
- Meimoun, A., Holtzman, T., Weissman, Z., McBride, H. J., Stillman, D. J., Fink, G. R., and Kornitzer, D. (2000). Degradation of the transcription factor Gcn4 requires the kinase Pho85 and the SCF(CDC4) ubiquitin-ligase complex. *Mol Biol Cell* 11, 915-927.
- Merz, K. (2007) *In vivo* Analyse der Chromatinstruktur ribosomaler DNA in *S. cerevisiae*, Dissertation, Universität Regensburg.
- Milkereit, P. (1999) Untersuchungen zum Mechanismus der rRNA-Synthese in *S. cerevisiae*, Dissertation, Universität Heidelberg.
- Milkereit, P., Schultz, P., and Tschochner, H. (1997). Resolution of RNA polymerase I into dimers and monomers and their function in transcription. *Biol Chem* 378, 1433-1443.
- Milkereit, P., and Tschochner, H. (1998). A specialized form of RNA polymerase I, essential for initiation and growth-dependent regulation of rRNA synthesis, is disrupted during transcription. *Embo J* 17, 3692-3703.
- Miller, G., Panov, K. I., Friedrich, J. K., Trinkle-Mulcahy, L., Lamond, A. I., and Zomerdijs, J. C. (2001). hRRN3 is essential in the SL1-mediated recruitment of RNA Polymerase I to rRNA gene promoters. *Embo J* 20, 1373-1382.
- Miller, O. L., Jr., and Beatty, B. R. (1969). Visualization of nucleolar genes. *Science* 164, 955-957.
- Mnaimneh, S., Davierwala, A. P., Haynes, J., Moffat, J., Peng, W. T., Zhang, W., Yang, X., Pootoolal, J., Chua, G., Lopez, A., *et al.* (2004). Exploration of essential gene functions via titratable promoter alleles. *Cell* 118, 31-44.
- Moorefield, B., Greene, E. A., and Reeder, R. H. (2000). RNA polymerase I transcription factor Rrn3 is functionally conserved between yeast and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4724-4729.
- Morcillo, G., De la Torre, C., and Gimenez-Martin, G. (1976). Nucleolar transcription during plant mitosis. In situ assay for RNA polymerase activity. *Exp Cell Res* 102, 311-316.
- Moritz, M., Paulovich, A. G., Tsay, Y. F., and Woolford, J. L., Jr. (1990). Depletion of yeast ribosomal proteins L16 or rp59 disrupts ribosome assembly. *J Cell Biol* 111, 2261-2274.
- Moss, T. (2004). At the crossroads of growth control; making ribosomal RNA. *Curr Opin Genet Dev* 14, 210-217.
- Moss, T., and Stefanovsky, V. Y. (2002). At the center of eukaryotic life. *Cell* 109, 545-548.
- Mougey, E. B., O'Reilly, M., Osheim, Y., Miller, O. L., Jr., Beyer, A., and Sollner-Webb, B. (1993). The terminal balls characteristic of eukaryotic rRNA transcription units in chromatin spreads are rRNA processing complexes. *Genes Dev* 7, 1609-1619.

- Musters, W., Knol, J., Maas, P., Dekker, A. F., van Heerikhuizen, H., and Planta, R. J. (1989). Linker scanning of the yeast RNA polymerase I promoter. *Nucleic Acids Res* 17, 9661-9678.
- Muth, V., Nadaud, S., Grummt, I., and Voit, R. (2001). Acetylation of TAF(I)68, a subunit of TFIIB/SL1, activates RNA polymerase I transcription. *Embo J* 20, 1353-1362.
- Nogi, Y., Vu, L., and Nomura, M. (1991a). An approach for isolation of mutants defective in 35S ribosomal RNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7026-7030.
- Nogi, Y., Yano, R., and Nomura, M. (1991b). Synthesis of large rRNAs by RNA polymerase II in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3962-3966.
- Nomura, M. (1998). Transcription Factors Used by *Saccharomyces cerevisiae* RNA Polymerase I and the Mechanism of Initiation. In *Transcription of Ribosomal RNA Genes by Eukaryotic RNA Polymerase I*, M. R. Paule, ed. (Springer-Verlag and R.G. Landes Company).
- Oakes, M., Aris, J. P., Brockenbrough, J. S., Wai, H., Vu, L., and Nomura, M. (1998). Mutational analysis of the structure and localization of the nucleolus in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 143, 23-34.
- Oakes, M., Nogi, Y., Clark, M. W., and Nomura, M. (1993). Structural alterations of the nucleolus in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I. *Mol Cell Biol* 13, 2441-2455.
- Oakes, M., Siddiqi, I., Vu, L., Aris, J., and Nomura, M. (1999). Transcription factor UAF, expansion and contraction of ribosomal DNA (rDNA) repeats, and RNA polymerase switch in transcription of yeast rDNA. *Mol Cell Biol* 19, 8559-8569.
- Olson, M. O. (2004). Sensing cellular stress: another new function for the nucleolus? *Sci STKE* 2004, pe10.
- Olson, M. O., Hingorani, K., and Szebeni, A. (2002). Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. *Int Rev Cytol* 219, 199-266.
- O'Sullivan, A. C., Sullivan, G. J., and McStay, B. (2002). UBF binding in vivo is not restricted to regulatory sequences within the vertebrate ribosomal DNA repeat. *Mol Cell Biol* 22, 657-668.
- Panov, K. I., Friedrich, J. K., and Zomerdijk, J. C. (2001). A step subsequent to preinitiation complex assembly at the ribosomal RNA gene promoter is rate limiting for human RNA polymerase I-dependent transcription. *Mol Cell Biol* 21, 2641-2649.
- Panova, T. B., Panov, K. I., Russell, J., and Zomerdijk, J. C. (2006). Casein kinase 2 associates with initiation-competent RNA polymerase I and has multiple roles in ribosomal DNA transcription. *Mol Cell Biol* 26, 5957-5968.
- Paule, M. R., and White, R. J. (2000). Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res* 28, 1283-1298.
- Pederson, T. (1998). The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res* 26, 3871-3876.
- Pelletier, G., Stefanovsky, V. Y., Faubladier, M., Hirschler-Laszkiewicz, I., Savard, J., Rothblum, L. I., Cote, J., and Moss, T. (2000). Competitive recruitment of CBP and Rb-HDAC regulates UBF acetylation and ribosomal transcription. *Mol Cell* 6, 1059-1066.
- Peyroche, G., Milkereit, P., Bischler, N., Tschochner, H., Schultz, P., Sentenac, A., Carles, C., and Riva, M. (2000). The recruitment of RNA polymerase I on rDNA is mediated by the interaction of the A43 subunit with Rrn3. *Embo J* 19, 5473-5482.
- Porath, J., and Flodin, P. (1959). Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature* 183, 1657-1659.

- Powers, T., and Walter, P. (1999). Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 10, 987-1000.
- Puvion-Dutilleul, F., Mazan, S., Nicoloso, M., Christensen, M. E., and Bachellerie, J. P. (1991). Localization of U3 RNA molecules in nucleoli of HeLa and mouse 3T3 cells by high resolution in situ hybridization. *Eur J Cell Biol* 56, 178-186.
- Raska, I., Koberna, K., Malinsky, J., Fidlerova, H., and Masata, M. (2004). The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biol Cell* 96, 579-594.
- Raska, I., Shaw, P. J., and Cmarko, D. (2006). Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Curr Opin Cell Biol* 18, 325-334.
- Reeder, R. H., and Lang, W. H. (1998). Stopping RNA Polymerase I. In *Transcription of Ribosomal RNA Genes by Eukaryotic RNA Polymerase I*, M. R. Paule, ed. (Springer-Verlag and R.G. Landes Company).
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 17, 1030-1032.
- Rozijn, T. H., and Tonino, G. J. (1964). Studies on the Yeast Nucleus. I. The Isolation of Nuclei. *Biochim Biophys Acta* 91, 105-112.
- Russell, J., and Zomerdijk, J. C. (2005). RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends Biochem Sci* 30, 87-96.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sandmeier, J. J., French, S., Osheim, Y., Cheung, W. L., Gallo, C. M., Beyer, A. L., and Smith, J. S. (2002). RPD3 is required for the inactivation of yeast ribosomal DNA genes in stationary phase. *Embo J* 21, 4959-4968.
- Scheer, U., and Rose, K. M. (1984). Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 1431-1435.
- Scheer, U., and Weisenberger, D. (1994). The nucleolus. *Curr Opin Cell Biol* 6, 354-359.
- Schlosser, A., Bodem, J., Bossemeyer, D., Grummt, I., and Lehmann, W. D. (2002). Identification of protein phosphorylation sites by combination of elastase digestion, immobilized metal affinity chromatography, and quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry. *Proteomics* 2, 911-918.
- Schmitt, M. E., Brown, T. A., and Trumpower, B. L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 18, 3091-3092.
- Schnapp, A., Pfliegerer, C., Rosenbauer, H., and Grummt, I. (1990). A growth-dependent transcription initiation factor (TIF-IA) interacting with RNA polymerase I regulates mouse ribosomal RNA synthesis. *Embo J* 9, 2857-2863.
- Schnapp, A., Schnapp, G., Erny, B., and Grummt, I. (1993). Function of the growth-regulated transcription initiation factor TIF-IA in initiation complex formation at the murine ribosomal gene promoter. *Mol Cell Biol* 13, 6723-6732.
- Schnapp, G., Schnapp, A., Rosenbauer, H., and Grummt, I. (1994). TIF-IC, a factor involved in both transcription initiation and elongation of RNA polymerase I. *Embo J* 13, 4028-4035.
- Schneider, D. A., French, S. L., Osheim, Y. N., Bailey, A. O., Vu, L., Dodd, J., Yates, J. R., Beyer, A. L., and Nomura, M. (2006). RNA polymerase II elongation factors Spt4p and Spt5p play roles in

- transcription elongation by RNA polymerase I and rRNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 12707-12712.
- Schultz, M. C., Reeder, R. H., and Hahn, S. (1992). Variants of the TATA-binding protein can distinguish subsets of RNA polymerase I, II, and III promoters. *Cell* *69*, 697-702.
- Schultz, P., Celia, H., Riva, M., Sentenac, A., and Oudet, P. (1993). Three-dimensional model of yeast RNA polymerase I determined by electron microscopy of two-dimensional crystals. *Embo J* *12*, 2601-2607.
- Siddiqi, I. N., Dodd, J. A., Vu, L., Eliason, K., Oakes, M. L., Keener, J., Moore, R., Young, M. K., and Nomura, M. (2001). Transcription of chromosomal rRNA genes by both RNA polymerase I and II in yeast uaf30 mutants lacking the 30 kDa subunit of transcription factor UAF. *Embo J* *20*, 4512-4521.
- Sikorski, R. S., and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *122*, 19-27.
- Spahn, C. M., Beckmann, R., Eswar, N., Penczek, P. A., Sali, A., Blobel, G., and Frank, J. (2001). Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell* *107*, 373-386.
- Stefanovsky, V., Langlois, F., Gagnon-Kugler, T., Rothblum, L. I., and Moss, T. (2006a). Growth factor signaling regulates elongation of RNA polymerase I transcription in mammals via UBF phosphorylation and r-chromatin remodeling. *Mol Cell* *21*, 629-639.
- Stefanovsky, V. Y., Bazett-Jones, D. P., Pelletier, G., and Moss, T. (1996). The DNA supercoiling architecture induced by the transcription factor xUBF requires three of its five HMG-boxes. *Nucleic Acids Res* *24*, 3208-3215.
- Stefanovsky, V. Y., Langlois, F., Bazett-Jones, D., Pelletier, G., and Moss, T. (2006b). ERK modulates DNA bending and enhancesome structure by phosphorylating HMG1-boxes 1 and 2 of the RNA polymerase I transcription factor UBF. *Biochemistry* *45*, 3626-3634.
- Stefanovsky, V. Y., Pelletier, G., Bazett-Jones, D. P., Crane-Robinson, C., and Moss, T. (2001a). DNA looping in the RNA polymerase I enhancesome is the result of non-cooperative in-phase bending by two UBF molecules. *Nucleic Acids Res* *29*, 3241-3247.
- Stefanovsky, V. Y., Pelletier, G., Hannan, R., Gagnon-Kugler, T., Rothblum, L. I., and Moss, T. (2001b). An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Mol Cell* *8*, 1063-1073.
- Steffan, J. S., Keys, D. A., Dodd, J. A., and Nomura, M. (1996). The role of TBP in rDNA transcription by RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*: TBP is required for upstream activation factor-dependent recruitment of core factor. *Genes Dev* *10*, 2551-2563.
- Steffan, J. S., Keys, D. A., Vu, L., and Nomura, M. (1998). Interaction of TATA-binding protein with upstream activation factor is required for activated transcription of ribosomal DNA by RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae* in vivo. *Mol Cell Biol* *18*, 3752-3761.
- Steinbauer, R. (2006) Posttranslationale Modifikationen und Funktion des Transkriptionsfaktors Rrn3p, Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- Stevens, A. R., and Pachler, P. F. (1973). RNA synthesis and turnover during density-inhibited growth and encystment of *Acanthamoeba castellanii*. *J Cell Biol* *57*, 525-537.
- Taxis, C., Vogel, F., and Wolf, D. H. (2002). ER-golgi traffic is a prerequisite for efficient ER degradation. *Mol Biol Cell* *13*, 1806-1818.

- Teichert, U., Mechler, B., Muller, H., and Wolf, D. H. (1989). Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation, and cell survival. *J Biol Chem* 264, 16037-16045.
- Thumm, M. (2000). Structure and function of the yeast vacuole and its role in autophagy. *Microsc Res Tech* 51, 563-572.
- Tower, J., and Sollner-Webb, B. (1987). Transcription of mouse rDNA is regulated by an activated subform of RNA polymerase I. *Cell* 50, 873-883.
- Tsang, C. K., Bertram, P. G., Ai, W., Drenan, R., and Zheng, X. F. (2003). Chromatin-mediated regulation of nucleolar structure and RNA Pol I localization by TOR. *Embo J* 22, 6045-6056.
- Tschochne, H., and Milkereit, P. (1997). RNA polymerase I from *S. cerevisiae* depends on an additional factor to release terminated transcripts from the template. *FEBS Lett* 410, 461-466.
- Tschochner, H., and Hurt, E. (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol* 13, 255-263.
- Tuan, J. C., Zhai, W., and Comai, L. (1999). Recruitment of TATA-binding protein-TAFI complex SL1 to the human ribosomal DNA promoter is mediated by the carboxy-terminal activation domain of upstream binding factor (UBF) and is regulated by UBF phosphorylation. *Mol Cell Biol* 19, 2872-2879.
- van Beekvelt, C. A., de Graaff-Vincent, M., Faber, A. W., van't Riet, J., Venema, J., and Raue, H. A. (2001). All three functional domains of the large ribosomal subunit protein L25 are required for both early and late pre-rRNA processing steps in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 29, 5001-5008.
- van der Sande, C. A., Kulkens, T., Kramer, A. B., de Wijs, I. J., van Heerikhuizen, H., Klotwijk, J., and Planta, R. J. (1989). Termination of transcription by yeast RNA polymerase I. *Nucleic Acids Res* 17, 9127-9146.
- Vu, L., Siddiqi, I., Lee, B. S., Josaitis, C. A., and Nomura, M. (1999). RNA polymerase switch in transcription of yeast rDNA: role of transcription factor UAF (upstream activation factor) in silencing rDNA transcription by RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4390-4395.
- Warner, J. R. (1990). The nucleolus and ribosome formation. *Curr Opin Cell Biol* 2, 521-527.
- Warner, J. R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* 24, 437-440.
- White, R. J. (2005). RNA polymerases I and III, growth control and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 69-78.
- Yamamoto, R. T., Nogi, Y., Dodd, J. A., and Nomura, M. (1996). RRN3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an essential RNA polymerase I transcription factor which interacts with the polymerase independently of DNA template. *Embo J* 15, 3964-3973.
- Yuan, X., Zhao, J., Zentgraf, H., Hoffmann-Rohrer, U., and Grummt, I. (2002). Multiple interactions between RNA polymerase I, TIF-IA and TAF(I) subunits regulate preinitiation complex assembly at the ribosomal gene promoter. *EMBO Rep* 3, 1082-1087.
- Zaragoza, D., Ghavidel, A., Heitman, J., and Schultz, M. C. (1998). Rapamycin induces the G0 program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway. *Mol Cell Biol* 18, 4463-4470.
- Zhao, J., Yuan, X., Frodin, M., and Grummt, I. (2003). ERK-dependent phosphorylation of the transcription initiation factor TIF-IA is required for RNA polymerase I transcription and cell growth. *Mol Cell* 11, 405-413.

DANKSAGUNG

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Herbert Tschochner, der mir die Möglichkeit gab, in einem sehr gut ausgestatteten Institut an einem interessanten Thema zu forschen. Dadurch dass ich häufig großen Freiraum bei der Planung, Durchführung und Auswertung meiner Versuche hatte und an mehreren internationalen Tagungen teilnehmen konnte, habe ich viele wertvolle Erfahrungen gesammelt.

Neben Prof. Tschochner haben insbesondere Sébastien Ferreira-Cerca, Jochen Gerber und Dr. Philipp Milkereit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Darüber hinaus wurde ich von Jochen Abel, Edith Aichinger, Dr. Mirko Bier, Esther Draken, Dr. Stephan Fath, Dr. Joachim Griesenbeck, Kristin Hergert, Anja Jacob, Dr. Holger Kühn, Felix List, Dr. Helfried Mallow, Gisela Pöll, Dr. Katrin Ridinger, Robert Steinbauer und Ulrike Stöckl unterstützt.

Vielen Dank für eure Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit!!!

Allen anderen Kollegen sei ebenfalls für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima gedankt.

Sébastien Ferreira-Cerca möchte ich zudem dafür danken, dass er mich auch außerhalb des Labors stets liebevoll unterstützt hat.

Ein besonderer Dank gebührt ferner meinen Eltern, die mir auf meinem bisherigen Lebensweg immer hilfreich zur Seite standen.